N° D'ORDRE :
69

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Madeleine LAFON

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 2 Mars 1955, *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
ROUSSET, RIBÉREAU-GAYON — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler, Paris-16e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547308_0047

N° D'ORDRE :
69

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Madeleine LAFON

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 2 Mars 1955, *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
ROUSSET, RIBÉREAU-GAYON — *Examinateurs.*

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler, Paris-16e

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.	
Doyen	BRUS	
Doyens honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	PICART	Membre de l'Institut
	DUPONT	Directeur de l'École Normale Sup.
	CHAINE	
	MERCIER	
Professeurs honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	BOUNHIOL	
	DEVAUX	Membre de l'Institut
	DUPONT	Directeur de l'École Normale Sup.
	PICART	Membre de l'Institut
	DAURE	Recteur de l'Académie de Caen
	CHAINE	
	KASTLER	Professeur à la Sorbonne
	QUELET	Professeur à la Sorbonne
Professeurs	MERCIER	Radioélectricité
	MILLOUX	Calcul infinitésimal
	DANGEARD	Botanique
	GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale
	CAU	Physique expérimentale
	BRUS	Chimie
	AVEL	Zoologie et Physiologie animale
	ROUSSET	Physique générale
	ROGER	Mécanique rationnelle
	WEILL	Anatomie comparée et Embryogénie
	SERVANT	Physique
	DUFRESNOY	Mathématiques générales
	LAFON	Physiologie générale
	BOUNHIOL	Zoologie
	PISOT	Calcul des probabilités
	DAVID	Biologie végétale
	GAY	Minéralogie
	SCHOELLER	Géologie
	CALAS	Chimie organique
	GUIZONNIER	Physique
	ALLARD	Chimie
	LAMARE	Géologie et Minéralogie
	COLMEZ	Mathématiques
	PATY	Chimie P. C. B.
	PACAULT	Chimie physique
	Mlle JOSIEN	Chimie minérale
	RIBÉREAU-GAYON	Œnologie et chimie agricole
	CAMBAR	Biologie générale
	MALVESIN-FABRE.	Anthropologie et préhistoire
	VIGNEAUX	Géologie
Maître de conférences honoraire	de PUYMALY	
Maîtres de conférences	SÉCHET	Botanique
	JEAN	Physique théorique
Secrétaire principal	ARTIGUELONG	

A MES PARENTS

Notre thèse s'est directement inspirée des travaux de

Monsieur L. GENEVOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

Il nous a conseillée, il nous a suggéré des expériences décisives et délicates qu'il nous a autorisée à effectuer dans son laboratoire ; il nous a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Nous lui exprimons ici notre reconnaissante et respectueuse admiration.

Monsieur J. RIBEREAU-GAYON

Professeur d'Œnologie et Chimie Agricole à la Faculté des Sciences de Bordeaux
Directeur de la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

nous a, par son enseignement, donné le goût de la recherche et a dirigé ce travail, effectué dans son laboratoire. Ses conseils et ses encouragements ont été pour nous une aide précieuse.

Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance.

Monsieur E. PEYNAUD

Ingénieur-Docteur Chargé de Recherches à la Station Agronomique
et Œnologique de Bordeaux

nous a prodigué tout au long de ce travail ses conseils amicaux et ses critiques avisées.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

Nous remercions :

le Centre National de la Recherche Scientifique

dont l'aide matérielle a permis la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier aussi :

l'Institut National de la Recherche Agronomique

qui a bien voulu accueillir notre travail dans ses Annales, et par là nous permettre d'imprimer cette thèse.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

par

Mlle Madeleine LAFON

Ingénieur-Chimiste E. C. B.
Docteur ès Sciences physiques

INTRODUCTION

Le point de départ de notre étude est l'hypothèse formulée par L. Genevois en 1936 (31), d'après laquelle les produits secondaires formés au cours de la fermentation alcoolique dérivent de la fermentation glycéropyruvique du sucre ; le glycérol représente la contre-partie des autres produits secondaires, cette équivalence pouvant être exprimée par une relation quantitative.

On sait en effet que la fermentation alcoolique du sucre par la levure ne forme pas uniquement de l'alcool et du gaz carbonique. On trouve toujours dans le milieu fermenté d'autres produits qui représentent une fraction non négligeable du sucre initial. On les appelle les produits secondaires de la fermentation.

L'équation de Gay-Lussac :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$$

était une simple relation pondérale entre le sucre, l'alcool et le gaz carbonique. On admettait d'ailleurs que cette relation n'était pas absolument exacte, car Lavoisier avait signalé la formation d'un acide organique qu'il pensait être l'acide acétique.

C'est Pasteur qui le premier démontra l'existence d'autres produits de la fermentation. Dès 1858, il signalait la formation normale et constante d'acide succinique et de glycérol à partir du sucre dans la fermentation alcoolique (94). Dans son mémoire de juin 1859 (95), où il résumait ses études sur la fermentation alcoolique, il établissait les différentes proportions des produits formés :

« Sur 100 g de sucre qui fermentent, 5 à 6 g ne suivent pas l'équation de Lavoisier et de Gay-Lussac, et cette portion de sucre se transforme

en assimilant de l'eau de manière à fournir dans les cas les plus ordinaires :

Acide succinique	0,6 à 0,7 g
Glycérine	3,2 à 3,6 g
Acide carbonique	0,6 à 0,7 g
Cellulose, matières grasses et autres produits encore indéterminés	1,2 à 1,5 g
	5,6 à 6,5 g

Le reste du sucre paraît former équation avec tout l'alcool et le surplus de l'acide carbonique suivant les rapports de l'égalité de Lavoisier et de Gay-Lussac.

Pasteur donnait ainsi le premier bilan de la fermentation faisant intervenir des produits secondaires. Il rechercha le glycérol et l'acide succinique dans les vins, et les teneurs qu'il y trouva sont de l'ordre de celles que nous donnent les dosages actuels ».

On connaît aujourd'hui la présence d'autres produits de la fermentation. Déjà Béchamp, en 1863 (9), observa la formation d'acide acétique au cours de la fermentation alcoolique en anaérobiose, en quantités allant de 0,3 à 0,7 p. 100 du sucre fermenté. Duclaux a confirmé le fait en 1874 (23). La découverte du 2,3-butanediol remonte à Henninger (43), qui en 1882 signala dans les vins un glycol en C_4 ; il le nomma isobutylèneglycol et on l'a depuis identifié comme étant le 2,3-butanediol. Six ans plus tard Henninger et Sanson (44) démontrèrent que c'était un produit normal de la fermentation du sucre par les levures.

Claudon et Morin (19) en 1887 ont dosé les produits de la fermentation du sucre par les levures elliptiques. Ils ont obtenu, en g pour 100 kg de sucre :

Aldéhyde	traces
Alcool éthylique	50 615
Alcool propylique normal	2,0
Alcool isobutylique	1,5
Alcool amylique	51,0
Éther œnanthique	2,0
« Isobutylène glycol »	158
Glycérol	2 120
Acide acétique	205
Acide succinique	452

Laborde (64) en 1899 fit une étude soignée de la formation du glycérol ; il observa qu'elle dépend du milieu, de la variété de levure, de la nature du sucre ; elle augmente avec l'acidité, la température et la proportion de sucre. Il remarqua aussi qu'il se forme davantage de glycérol au début de la fermentation : dans la fermentation d'un moût à 180 g de sucre par litre, les 60 premiers grammes donnent 5,46 p. 100 de glycérol, alors que les derniers 60 grammes n'en donnent que 0,75 p. 100.

La question de l'origine de l'aldéhyde formée au cours des fermentations préoccupa beaucoup de chercheurs. Schutzenberger et Destrem (126), en 1879, indiquent la formation d'aldéhyde au cours de fermentations en anaérobiose et affirment que cette formation est liée

à la décomposition du sucre. Roeser (125) pensait de même en 1893, mais pour Kayser et Demolon (54) et pour Trillat et Sauton (138), il ne se formerait pas d'aldéhyde en anaérobiose ; sa présence dans les fermentations aérobies serait due à l'oxydation de l'alcool. Kostytschew et Hubbennet (60) en 1912 et Peltier (97) en 1913 ont prouvé que l'éthanal est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique du sucre, en démontrant sa formation dans les fermentations à l'abri de l'air et sa disparition après une addition au cours de la fermentation. Ajoutant du butanal à des fermentations, Peltier y trouvait du butanol ; il en concluait par analogie que la disparition de l'éthanal est due à sa transformation en éthanol. Lebedew et Griaznoff en 1912 affirmaient aussi que l'éthanal est un produit intermédiaire de la transformation du sucre (70).

Les premiers essais d'explication chimique de la présence de ces corps remontent à 1910, date à laquelle Neubauer et Fromherz (83) émirent l'hypothèse que l'acide pyruvique pouvait jouer un rôle intermédiaire dans la formation de l'éthanal. En 1911, Neuberg et ses collaborateurs (85) ont vérifié ces déductions et montré que l'acide pyruvique est facilement scindé en gaz carbonique et éthanal par une diastase sécrétée par la levure, la carboxylase.

En 1913, Fernbach et Schoen (28) mirent en évidence la formation d'acide pyruvique dans des fermentations conduites en présence de carbonate de calcium. Ces mêmes auteurs montrèrent en 1914 (29) que dans un milieu purement minéral, toujours en présence de carbonate de calcium, le taux d'acide pyruvique croît proportionnellement au sucre consommé : il était donc ainsi prouvé que l'acide pyruvique provient du sucre et qu'il est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique. Mais ces auteurs ne purent l'identifier dans des fermentations en milieu acide où il disparaît en effet aussi vite qu'il est formé. Cependant Bréchot et Haag en 1939 (13) ont réussi à le caractériser dans la fermentation d'un milieu minéral acide.

Entre 1910 et 1925, Neuberg et ses collaborateurs publièrent de nombreux travaux dans lesquels ils cherchaient à expliquer le mécanisme de formation des produits secondaires. Après avoir nié, en même temps que Buchner, la possibilité de la formation de l'éthanal à partir du sucre et soutenu sur ce sujet une polémique contre Kostytschew (88), Neuberg devait finalement apporter à cette théorie la meilleure preuve en utilisant une méthode de captation de l'éthanal par un de ses réactifs introduit dans le milieu en fermentation ; la formation des produits secondaires est alors modifiée. L'idée de ce procédé remonte à Jean-Baptiste Dumas (24). Kostytschew (59) l'avait utilisé en employant comme agent de captation le chlorure de zinc et Müller-Thurgau et Osterwalder (79), Connstein et Luedecke (20) et Schweizer (127) avaient

déjà montré que l'éthanal et le glycérol s'accumulent en présence d'acide sulfureux ou de sulfite de potassium. Ces derniers auteurs en avaient même déduit un procédé de fabrication industrielle du glycérol. NEUBERG et ses collaborateurs fixèrent l'éthanal par le sulfite de sodium et par le dimédon et constatèrent que dans ce cas le glycérol s'accumule (89). Ils émirent l'hypothèse qu'à tout moment de la fermentation, il y a équivalence entre glycérol et éthanal, l'éthanal provenant de la décarboxylation de l'acide pyruvique. NEUBERG et REINFURTH ont donc établi une deuxième forme de fermentation, ou fermentation glycéropyruvique (la première forme étant celle de GAY-LUSSAC) :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot COOH + C_3H_8O_3$$
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHO + CO_2 + C_3H_8O_3$$

NEUBERG et FÄRBER (84) montrèrent de même qu'en milieu alcalin la fermentation est profondément modifiée. NEUBERG et HIRSCH (86) établirent que dans ce cas l'éthanal subit une réaction de Cannizzaro : deux molécules d'éthanal donnent une molécule d'alcool et une molécule d'acide acétique. Finalement à une molécule d'acide acétique correspondent deux molécules de glycérol. C'est la troisième forme de fermentation du sucre, ou fermentation glycéroacétique :

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2CO_2 + 2C_3H_8O_3.$$

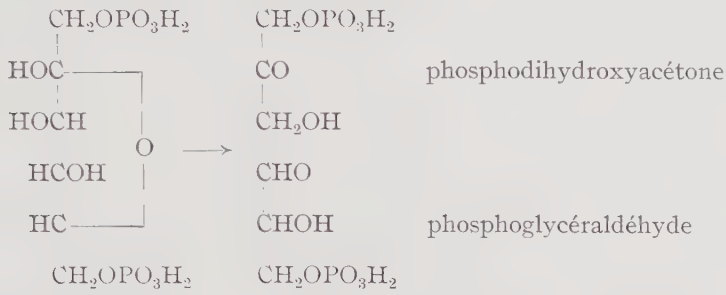
En réalité les trois types de fermentation précédents ne sont jamais purs ; il y a toujours un mélange de ces différentes réactions.

NEUBERG et REINFURTH en 1923 (90) constatèrent que si l'on ajoute de l'éthanal à une fermentation, il se forme de l'acétoïne. Ce corps avait été déjà découvert en 1907 dans les vins par SALOMONE. Ils admirent qu'il prend naissance par condensation de deux molécules d'éthanal sous l'action d'un enzyme, la « carboligase ». En 1925, KLUYVER, DONKER et VISSER'T HOOFT (58), utilisant la réaction de caractérisation de LEMOIGNE, montrèrent que la fermentation du sucre par la levure forme de l'acétoïne en aérobiose et du 2,3-butanediol en anaérobiose. PRITZKER et JUNGKUNZ en 1930 (115) redécouvrirent ce dernier dans les vins.

L. GENEVOIS en 1936 (31) essaya de relier les différents produits secondaires par une relation quantitative ; il émit l'hypothèse que l'acide succinique, l'acide acétique, l'éthanal non transformé, le 2,3-butanediol et l'acétoïne sont formés par le mécanisme de la fermentation glycéropyruvique de NEUBERG. Ils proviennent de l'acide pyruvique décarboxylé et doivent donc équivaloir le glycérol.

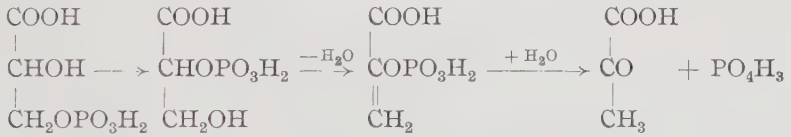
Le schéma de la théorie actuelle de la fermentation alcoolique a été donné par MEYERHOF, KIESSLING et SCHULZ en 1937 (76) ; nous en donnerons ici un aperçu rapide, nécessaire à la compréhension de l'hypothèse de L. GENEVOIS.

Le premier stade de la fermentation fait intervenir l'acide phosphorique ; il se forme des esters phosphoriques du glucose, qui se transforment les uns dans les autres pour donner finalement l'ester fructose 1,6-diphosphorique ou ester de HARDEN et YOUNG ; celui-ci est scindé sous l'influence de la zymohexase en deux corps en C_3 :



Ces deux corps tautomères sont en équilibre sous l'influence d'une isomérase ; l'équilibre a lieu pour 96,5 p. 100 du premier et 3,5 p. 100 du second, mais comme c'est ce dernier qui est utilisé dans la suite des réactions, l'équilibre est constamment déplacé en sa faveur et finalement tout se passe comme si tout l'ester de HARDEN et YOUNG était transformé en phosphoglycéraldéhyde.

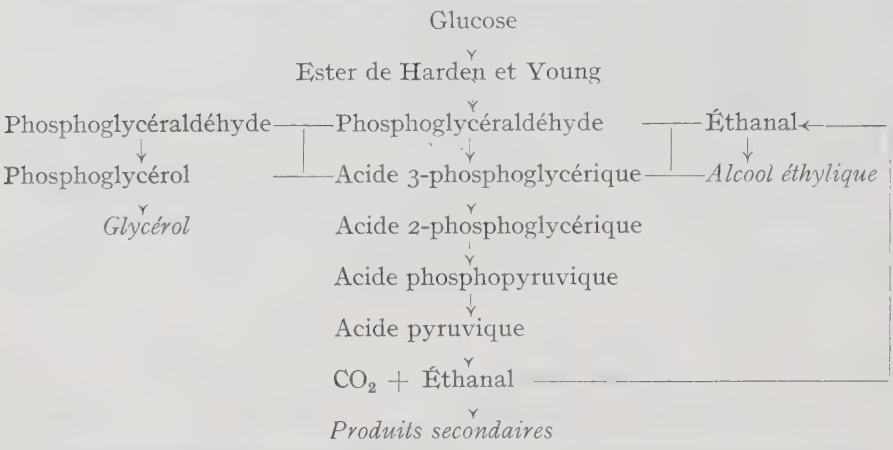
L'étape suivante est le mécanisme essentiel de la fermentation ; c'est une oxydoréduction qui porte sur une molécule de phosphoglycéraldéhyde et une molécule d'éthanal, celui-ci apparaissant plus loin dans la chaîne des réactions. Une molécule de phosphoglycéraldéhyde est oxydée en acide 3-phosphoglycérique, alors que la molécule d'éthanal est réduite en alcool. L'acide 3-phosphoglycérique donne naissance à l'acide pyruvique par une série de réactions :



L'acide pyruvique est décarboxylé en éthanal par la carboxylase et l'éthanal subit l'oxydoréduction précédente.

Au cours de la phase d'induction, au début de la fermentation, alors qu'il n'y a pas d'éthanal dans le milieu, l'oxydoréduction porte sur deux molécules de phosphoglycéraldéhyde, dont l'une est réduite en glycérol et l'autre est oxydée comme précédemment en donnant finalement naissance à l'acide pyruvique : c'est la fermentation glycéropyruvique découverte par NEUBERG. Elle est prépondérante au début, puis son pourcentage diminue et, comme il a déjà été indiqué, l'oxydoréduction normale conduit à l'alcool éthylique.

Le schéma suivant représente ces réactions :



On peut lier entre eux glycérol et produits secondaires par une relation numérique où chacun d'eux est affecté d'un coefficient tiré de l'équation chimique de sa formation. L. Genevois admet les réactions suivantes :

La formation de l'acide succinique peut être représentée par l'équation globale :

$$5CH_3CHO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + 3CH_3CH_2OH \qquad (I)$$

qui donne le bilan du phénomène sans prétendre en donner le mécanisme.

L'acide acétique se forme par dismutation selon la réaction de la fermentation alcaline de Neuberg :

$$2CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CH_3CH_2OH \qquad (II)$$

L'acétoïne est due à la condensation de deux molécules d'éthanal :

$$2CH_3CHO \rightarrow CH_3CHOHCOCH_3 \qquad (III)$$

Le 2,3-butanediol est formé par réduction de l'acétoïne, mais au point de vue du bilan tout se passe comme si une molécule d'éthanal se condensait avec une molécule d'éthanol :

$$CH_3CHO + CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHOHCHOHCH_3 \qquad (IV)$$

Soient s, a, m, b, h et g les concentrations respectives en acide succinique, acide acétique, acétoïne, 2,3-butanediol, éthanal et glycérol. L. Genevois propose la relation :

$$5s + 2a + b + 2m + h = \Sigma = g \qquad (V)$$

C'est cette équation qui nous servira d'hypothèse de travail dans la suite de notre étude.

Cette relation a été vérifiée déjà dans un certain nombre de cas par L. Genevois, E. Peynaud et J. Ribéreau-Gayon (36). En réalité,

il est apparu presque toujours un déficit et les auteurs observent que le plus souvent Σ est voisin de 0,9 g.

Les équations (I), (II), (III) et (IV) ont donné lieu à des recherches afin de préciser leur mécanisme (32).

D'autres corps ont été mis en évidence comme sous-produits normaux de la fermentation alcoolique. E. Peynaud et J. Ribéreau-Gayon (119), puis Kiessling (56), ont montré avec certitude la formation constante de petites quantités d'acide lactique. Pasteur niait la formation de cet acide par la fermentation alcoolique, mais par contre d'autres auteurs ont vu en lui un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique. Enfin Fernbach et Schoen (30) l'avaient mis en évidence dans la fermentation d'un milieu minéral en présence de carbonate de calcium, mais ils ne tiraient pas de conclusion quant à sa formation dans la fermentation normale. L'acide lactique provient d'une fermentation lactique directe du sucre, distincte de la fermentation alcoolique.

E. Peynaud (98) a également montré la formation d'une faible quantité d'acide citrique dans la fermentation alcoolique en anaérobiose. Le fait a été confirmé de nombreuses fois : Gentilini (37), Gobis (38), Rodopoulo (124). L. Genevois a supposé que cet acide pouvait se former par déshydrogénation de l'acide acétique formé au début de la fermentation par une série de réactions faisant intervenir 9 molécules d'éthanal pour une molécule d'acide citrique (c). Il a donc ajouté à l'équation le terme $9c$. Elle devient :

$$5s + 2a + b + 2m + h + 9c = \Sigma = g \qquad \text{(VI)}$$

$9c$ est en effet de l'ordre de grandeur du déficit du Σ de l'équation (V) par rapport à g.

Tout récemment L. Genevois (33), s'appuyant sur le fait que des levures fermentant sur un milieu chimiquement défini à base de saccharose, sans aucune trace de leucine, produisent des quantités notables d'alcool amylique, s'appuyant aussi sur la formation par certaines levures de caroténoïdes à partir d'acide acétique, par l'intermédiaire de l'acétone et de l'aldéhyde β méthylcrotonique (Schopfer, 1952), a formulé l'hypothèse d'une formation d'alcool amylique à partir de l'éthanal. Une molécule de glucose fermentant par les levures engendre 1 à 2 mmol d'alcool amylique.

Les réactions suivantes seraient en jeu :

$$2CH_3CHO + 2H_2O + 2A \rightarrow 2CH_3CO_2H + 2AH_2$$
$$2CH_3CO_2H \rightarrow CH_3COCH_3 + H_2O + CO_2$$
$$CH_3COCH_3 + CH_3CHO \rightarrow CH_3 - \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle |}{C}} = CH - CHO + H_2O$$

L'alcool amylique serait le produit de réduction de l'aldéhyde β méthylcrotonique :

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{C} = CH - CHO + 2AH_2 \rightarrow CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH_2 - CH_2OH + 2A$$

Finalement 3 mmol d'éthanal sont nécessaires pour donner 1 mmol d'alcool amylique. En représentant par y l'alcool amylique la relation devient, d'après GENEVOIS :

$$5s + 2a + b + 2m + h + 9c + 3y = \Sigma = g.$$

Cette relation, reconnue expérimentalement assez exacte dans les conditions normales de fermentation (si l'on met à part l'alcool amylique dont le dosage précis est difficile en milieu aussi dilué), doit être vérifiée dans toutes les conditions possibles. Les auteurs précédents l'ont confirmée seulement dans des cas où le taux de fermentation glycéropyruvique, et donc le glycérol formé, était assez peu variable.

Beaucoup de facteurs, en particulier le pH, la température, la composition du milieu, la présence des facteurs de croissance, etc. n'ont pas été étudiés. Cette relation, valable pour les *Saccharomyces*, n'a pas été étendue systématiquement à tous les genres de levures.

De plus le mécanisme de la formation des produits secondaires est encore discuté. La formation d'acide succinique, en tout ou partie, a été attribuée par certains auteurs à la transformation de l'acide glutamique selon le schéma d'EHRLICH, et même simplement du glycocolle, ou d'autres acides aminés, grâce à un phénomène de transamination. D'autre part, l'acide acétique d'un milieu fermenté peut provenir parfois d'un mécanisme oxydatif. Enfin la formation des dérivés butanedioliques a donné lieu à un grand nombre de travaux pour fixer la voie enzymatique suivie.

Il nous a donc paru nécessaire de préciser les réactions intermédiaires qui conduisent à la formation des produits secondaires. Nous avons pensé également que l'hypothèse de L. GENEVOIS méritait une plus ample confirmation.

Notre travail constitue une étude analytique de ces problèmes. Nous nous proposons tout d'abord d'étudier les méthodes de dosage des corps intervenant dans les bilans précédents. Nous avons été ainsi conduits à mettre au point et à adapter de nouvelles méthodes analytiques.

Nous déterminons la formation des produits secondaires avec un très grand nombre d'espèces de levures et dans différentes conditions de fermentation. L'aération, le pH, la température, la nature du milieu, la teneur en facteurs de croissance, l'influence des activeurs sont étudiés. Nous fixons entre quelles limites et dans quelles conditions cette hypo-

thèse demeure valable et se trouve confirmée, dans quels cas au contraire certains produits secondaires sont formés par d'autres voies.

Nous suivons ensuite les variations de la teneur en éthanal libre au cours de la fermentation et nous envisageons leur relation avec la formation des produits secondaires. Cette quantité d'éthanal libre dépend du taux de la fermentation glycéropyruvique et de la vitesse d'utilisation vers la formation des produits secondaires ; elle éclaire donc certains mécanismes.

Enfin, nous cherchons, en utilisant notamment des techniques de fermentations déviées, à préciser le mécanisme de formation de certains produits secondaires. Nous discutons particulièrement les cas de l'acide succinique et des produits butanedioliques.

Chapitre premier

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

Nous avons utilisé pour l'analyse des milieux fermentés, les méthodes énumérées ci-après. Beaucoup de ces méthodes avaient été mises au point dans les laboratoires de la Station œnologique, d'autres ont dû être adaptées par nos soins.

Pour doser le glycérol, nous avons utilisé dans les milieux non sucrés, la méthode Fatome modifiée par Peynaud (99) basée sur la réaction de Malaprade. Dans les milieux ayant plus de 50 g de sucre par litre, la défécation par la baryte ou la chaux en milieu alcoolique ne retient pas tout le sucre. Nous avons employé dans ce cas une technique utilisant la réaction colorée de l'acide chromotropique avec le formol obtenu par oxydation periodique du glycérol, décrite par Peynaud et Charpentié (106). La grande sensibilité de la réaction permet d'opérer la défécation sur le milieu sucré dilué, dans des conditions où elle est toujours efficace.

Le 2,3-butanediol a été dosé par la méthode Peynaud (100) par transformation en éthanal par oxydation periodique.

L'éthanal des milieux de fermentation est titré par la méthode Jaulmes et Espezel (48), après distillation à pH 8,5 (120). L'alcool a été déterminé par oxydation chromique, selon Cordebard (21).

L'acide acétique a été séparé par la méthode Duclaux-Gayon ; on a utilisé l'entraînement par la vapeur d'eau pour les mélanges d'acides volatils. L'acide lactique a été dosé selon la technique Peynaud et Charpentié (107), l'acide citrique par la méthode Kogan, modifiée par Peynaud.

Nos recherches nous ayant amenés à doser le méthanol, nous avons suivi la technique récemment publiée par Jacquin et Tavernier (47).

Nous avons établi un mode opératoire nouveau pour le dosage de l'acide succinique, simplification de la méthode de Peynaud (101). Nous avons encore précisé les conditions du dosage de petites quantités d'acide formique en présence d'acide acétique. Nous en donnons plus loin le mode opératoire, ainsi que celui du dosage colorimétrique du formol. Enfin, nous avons dû adapter les méthodes d'Hooreman (46) au dosage des composés acétoïniques dans les milieux de fermentation alcoolique.

I. — ÉTUDE D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE L'ACIDE SUCCINIQUE

Les méthodes utilisées jusqu'ici pour le dosage de l'acide succinique reposent sur une ou plusieurs des trois propriétés suivantes de cet acide : sa solubilité dans l'éther, l'insolubilité de certains de ses sels, notamment les sels de baryum, de plomb et d'argent ; sa résistance à l'oxydation.

Pasteur employait pour doser l'acide succinique une technique non spécifique basée sur sa solubilité dans l'éther, puis il la remplaça par une méthode faisant appel à l'insolubilité du succinate de calcium. Laborde aussi utilisa cette propriété (65).

D'autres auteurs, Macagno (71), Albahary (2), ont utilisé l'insolubilité des sels de plomb et de fer ; Muller (78), Rau (117), Espil (26), Kunz (63), Mestrezat (74), Muttelet (80) et Pozzi-Escot (114) ont basé leurs procédés sur l'insolubilité du succinate de baryum. De toutes ces méthodes qui, souvent, manquent de spécificité, la seule à retenir est celle de Kunz, mais elle est d'application longue et compliquée. De plus, comme nous le verrons plus loin, la précipitation du succinate de baryum est, dans certains milieux fermentés, difficilement complète.

Bien d'autres méthodes ont été proposées, en particulier des techniques enzymatiques utilisant la succinodéshydrogénase. D'autres encore font appel à la chromatographie pour séparer les acides organiques des liquides fermentés : Claborn et Patterson (18), Neish (81). Peu de procédés colorimétriques ont été indiqués ; signalons cependant la méthode récemment publiée par Babin (8), basée sur la possibilité de condensation des succinéines avec les phénols.

Peynaud (102) a proposé en 1946 un mode opératoire qui utilise une double extraction dans un appareil à épuisement continu. Une première extraction par l'éther entraîne l'acide succinique, accompagné de quantités variables d'autres acides. L'oxydation permanganique en milieu sulfurique détruit les acides organiques sans toucher à l'acide succinique. Après réduction de l'excès de permanganate par le bisulfite de sodium, on chasse les acides volatils par un barbotage de vapeur d'eau. Une deuxième extraction est nécessaire pour séparer l'acide succinique. On le précipite alors par le nitrate d'argent dans des conditions de pH bien déterminées. On filtre et on détermine l'argent en excès par une solution titrée de sulfocyanure de potassium.

Ce procédé donne de bons résultats, mais il est long ; de plus, nous y reviendrons, la précipitation du succinate d'argent est délicate, et elle ne donne aucune garantie de spécificité, la présence d'ions étrangers compromettant les résultats.

Marignan (72) a fait une étude très détaillée de la précipitation du succinate d'argent, de l'extraction par l'éther de l'acide succinique et

de l'oxydation permanganique des autres acides. Il a proposé une méthode applicable aux milieux non sucrés.

L'auteur fait agir directement le permanganate sur le vin à analyser, fortement acidifié par l'acide sulfurique. Après avoir réduit l'excès de permanganate, il entraîne les acides volatils par la vapeur, puis il sépare l'acide succinique par une extraction continue à l'éther et le titre par argentimétrie.

a) Essai de la technique de Marignan

Nous avons appliqué cette méthode à des vins rouges et nous avons obtenu les résultats que donne le tableau I.

TABLEAU I

Dosage de l'acide succinique par la technique de Marignan

Vin rouge n° 1		Vin rouge n° 2		Vin rouge n° 3	
	Acide succinique dosé méq par l.		Acide succinique dosé méq par l.		Acide succinique dosé méq par l.
		Méthode Peynaud	22,0	Méthode Peynaud	11,0
		Méthode par précipitation (1)	21,0	Méthode par précipitation (1)	9,5
Méthode Marignan Permanganate ajouté		Méthode Marignan Permanganate ajouté :		Méthode Marignan Permanganate ajouté :	
60 cm³	15,6	20 cm³	12,2	20 cm³	8,5
80 «	16,8	28 »	18,0	25 »	9,3
90 «	18,8	30 »	21,0	30 »	16
100 «	22,4	35 »	23,0		
120 »	23,2	50 »	25,2		

(1) Voir plus loin le mode opératoire.

On constate qu'on trouve avec la méthode MARIGNAN d'autant plus d'acide succinique qu'on utilise davantage de permanganate pour l'oxydation. On peut tirer deux conclusions de cette observation : il est très difficile de déterminer la dose exactement nécessaire de permanganate, donc d'obtenir des résultats absolument corrects. L'augmentation du taux de l'acide succinique avec la dose de permanganate conduit à penser que l'oxydation directe du vin forme de l'acide succinique à partir de certains corps.

La première de ces remarques nous a incités à élaborer une méthode de dosage plus sûre. Lorsqu'elle a été mise au point, nous avons recherché les substances du vin qui par oxydation sont susceptibles de donner de l'acide succinique.

b) Précipitation de l'acide succinique à l'état de succinate de baryum

Nous avons tout d'abord cherché à établir une technique de précipitation quantitative de l'acide succinique du vin à l'état de sel de baryum, par insolubilisation dans l'alcool. Nous avons essayé la précipitation dans différentes concentrations d'alcool pour un milieu synthétique et pour différents vins rouges.

Nous avons opéré de la façon suivante : dans des tubes de centrifugeuse, on place 20 cm³ du liquide à analyser, on le neutralise par l'ammoniaque au quart en présence de phénolphtaléine et on ajoute 3 cm³ de chlorure de baryum à 30 p. 100. On porte le titre alcoolique respectivement à 70, 75, 80, 85 et 90° par addition d'alcool absolu. On laisse une nuit en glacière, on centrifuge ; on décante et on lave le précipité à l'alcool.

On dissout le dépôt à l'ébullition avec 50 cm³ d'eau distillée acidulée par 2,5 cm³ d'acide sulfurique au tiers. Après lavage, on élimine le sulfate de baryum formé. Le filtrat est concentré pour chasser l'alcool, on l'oxyde par une ébullition de 10 minutes avec 10 à 15 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée. Après refroidissement, on détruit l'excès de permanganate par quelques gouttes de solution concentrée de bisulfite de sodium.

Les acides volatils sont chassés par entraînement à la vapeur de 300 à 400 cm³ d'eau, en concentrant le volume à moins de 20 cm³. Puis on procède à l'extraction par l'éther dans l'appareil de Hagen ; on poursuit l'opération durant 5 heures. On précipite l'acide succinique extrait à l'état de succinate d'argent dans les conditions qu'indique Marignan et on titre l'argent restant sur une partie aliquote, par le sulfocyanure de potassium N/20.

Le tableau II rassemble les résultats obtenus. On voit que la précipitation du succinate de baryum est difficile et reste toujours incomplète pour la solution synthétique, tandis qu'à partir de 75° d'alcool, on obtient des chiffres remarquablement constants pour les vins rouges. Ces résultats différents tiennent aux difficultés de floculation du succinate de baryum en milieu simple, alors que dans les vins rouges des phénomènes d'entraînement réciproque des colloïdes assurent la précipitation complète. Ces mêmes difficultés se présentent pour les vins blancs pour lesquels la précipitation reste toujours partielle. Si l'on peut utiliser cette méthode pour la plupart des vins rouges, elle n'est donc pas applicable à d'autres milieux, et nous sommes revenus à l'extraction par l'éther comme moyen de séparation. Nous avons cependant cherché à éviter une double extraction. Pour ce faire, nous avons essayé de titrer directement l'acide succinique sur le liquide obtenu après oxydation des acides organiques et élimination des acides volatils. Ce liquide contient, à côté

de l'acide succinique, de l'acide sulfurique et des sels de manganèse. Il n'est pas possible d'y effectuer la précipitation du succinate d'argent, et nous avons étudié un dosage acidimétrique au potentiomètre de QUÉRÉ (66).

TABLEAU II

Degré alcoolique de précipitation du succinate de baryum.

Acide succinique trouvé en méq par litre.

Degré alcoolique de la précipitation	Solution synthétique (*) 20,0 méq par litre	Vin rouge
70°	17,0	13,7
75°	16,5	14,5
80°	16,0	14,5
85°	14,5	14,5
90°	19,5	14,0

(*) La solution synthétique contient tous les acides organiques du vin.

c) Étude d'une titration potentiométrique

Nous avons vu qu'après l'oxydation, le liquide contient une certaine quantité d'acide sulfurique. Le pK de la deuxième fonction de l'acide sulfurique est 1,62 (KOLTHOFF), les pK de l'acide succinique sont 4,18 pour la première fonction (JONES) et 5,23 pour la seconde (KOLTHOFF). Pour titrer acidimétriquement tout l'acide succinique à 1 p. 100 près, il faudrait donc titrer à partir de pH 2,18, mais on compte alors une grande partie de l'acide sulfurique et les courbes de titration d'un mélange des deux acides ne présentent pas un palier caractéristique permettant un dosage. On tourne la difficulté en titrant de pH 4,18 à pH 7,5. A pH 4,18, tout l'acide sulfurique a été neutralisé, et on titre ainsi la moitié de la première fonction succinique et les 9/10 de la seconde, soit au total les 7/10 de l'acide succinique du milieu.

Nous utilisons pour le titrage la baryte en solution N/20 de préférence à la soude, l'acide sulfurique étant ainsi éliminé à l'état de sulfate de baryum.

Nous avons expérimenté ce procédé sur des solutions de titres connus en acide succinique, additionnées de quantités variables d'acide sulfurique. Voici à titre d'exemple les résultats obtenus dans un cas. On opère sur 25 cm³ de solution d'acide succinique. Le titrage direct donne 19,2 méq d'acide succinique par litre.

Acide sulfurique ajouté	Acide succinique trouvé
0	19,4 méq
10 cm³ N/10	19,4
0,5 cm³ au tiers	19,2
1 cm³ au tiers	19,4

Ce mode de titrage est donc correct et peut être appliqué au dosage de l'acide succinique. Il est bon de souligner que ce procédé n'est pas moins spécifique que la titration par l'argent, qui ne donne des résultats valables qu'autant qu'on a éliminé tous les anions autres que l'anion succinique.

d) Mode opératoire de la méthode proposée

20 cm³ de liquide sont évaporés à moitié volume à feu doux pour chasser l'alcool, puis transvasés quantitativement dans le tube extracteur d'un appareil de HAGEN et additionnés de 1 cm³ d'acide sulfurique au tiers. On complète à 20 cm³. L'acide succinique est recueilli dans 10 cm³ d'eau distillée placés dans le ballon de l'appareil. La circulation de l'éther doit être rapide, l'eau du bain-marie étant maintenue à une température de 75 à 80° et la réfrigération étant énergique. Après 5 heures d'extraction, on distille l'éther, puis on oxyde le liquide extrait par le permanganate de potassium.

L'oxydation se fait dans le ballon même où a eu lieu l'extraction. On ajoute 1 cm³ d'acide sulfurique au tiers de façon à amener le pH à une valeur inférieure ou égale à 1, et 10 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée. On porte à une douce ébullition pendant 15 minutes. Après refroidissement, on détruit l'excès de permanganate par quelques gouttes de bisulfite de sodium en solution concentrée, puis on chasse par la vapeur d'eau les acides volatils en distillant 300 à 400 cm³ d'eau.

Le milieu ne contient plus alors que les acides sulfurique et succinique. On amène à pH 4,18 par la baryte d'abord en solution saturée, puis N/20. On titre alors l'acide succinique par la baryte N/20, de pH 4,18 à pH 7,5 au potentiomètre QUÉRÉ. Soit n le nombre des cm³ de baryte N/20 qui ont été consommés.

On a vu que de pH 4,18 à pH 7,5 on titre les 7/10 de l'acide succinique. La teneur du milieu de fermentation en acide succinique, en milliéquivalents par litre, est alors donnée par la formule :

$$\frac{0{,}05 \times n \times 10 \times 1\,000}{7 \times 20} = n \times 3{,}57.$$

La précision obtenue est de l'ordre de 2 à 3 p. 100.

Nous avons éprouvé cette méthode sur des vins additionnés ou non d'acide succinique. Voici les résultats obtenus pour un vin blanc. Les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

Acide succinique ajouté	Acide succinique trouvé	Acide succinique théorique
—	—	—
0	16,8	—
2	18,9	18,8
3	19,7	19,8

On retrouve les quantités ajoutées d'une manière très satisfaisante et nous avons adopté la technique décrite précédemment pour l'établissement de nos bilans.

e) Recherche de substances donnant de l'acide succinique par oxydation permanganique. Recherche du 1,4 butanediol

Dans le but d'expliquer l'augmentation du taux d'acide succinique observée dans la technique de MARIGNAN, nous avons oxydé des solutions de différentes substances existant dans les vins, et nous avons recherché l'acide succinique éventuellement formé.

Divers types de polyphénols ont été d'abord essayés : tanins, anthocyannes de raisin et du vin. Ils n'ont pas donné d'acide succinique, non plus que l'oxydation de différents acides aminés, entre autres l'acide aspartique et l'asparagine. Seuls l'acide glutamique et la glutamine donnent par oxydation permanganique en milieu sulfurique des quantités notables d'acide succinique. Le rendement est de 75 p. 100 pour l'acide glutamique et de 50 p. 100 pour la glutamine. Cependant leur taux dans les vins et les milieux fermentés est habituellement trop faible pour expliquer les erreurs en excès de 3 ou 4 méq qui ont été constatées.

S'il existe dans les milieux fermentés du 1,4-butanediol $CH_2OH.CH_2.CH_2OH$, celui-ci est transformé quantitativement en acide succinique par l'oxydation permanganique. Bien que ce glycol n'ait jamais été signalé comme un produit de la fermentation, l'hypothèse de sa formation, par un mode de condensation de l'éthanal différent de celui du 2,3-butanediol, pourrait être envisagée. Nous avons donc recherché ce corps dans les vins.

Il est difficilement extractible par l'éther sulfurique, puisqu'une extraction deux fois plus longue que celle qui est nécessaire à épuiser tout l'acide succinique, ne livre que la moitié du 1,4-butanediol. On peut séparer ce corps par entraînement à la vapeur, en présence de carbonate de sodium anhydre. Il bout à 235° et est donc moins volatil que son isomère 2,3. Il faut recueillir 800 cm^3 de distillat pour avoir tout le 1,4-butanediol d'une prise de 100 cm^3, d'abord concentrée à 10 cm^3.

Ce distillat est lui-même concentré lentement jusqu'à 20 cm^3 sous une colonne de rectification à pointes de 50 cm de hauteur. On réalise un milieu N/2 en acide sulfurique, on ajoute 10 cm^3 de solution saturée de permanganate de potassium, on porte 15 minutes à l'ébullition. L'acide succinique éventuellement formé est extrait par l'éther et titré potentiométriquement.

Ce mode opératoire permet de retrouver assez bien une addition de 1,4-butanediol faite à un vin, mais appliqué à une série de vins naturels,

trois vins rouges et un vin blanc de Bordeaux, il nous a toujours donné des résultats négatifs. Cette recherche a été également négative sur le résidu de concentration sous reflux de 100 litres de liquide fermenté préparé de la façon suivante : on fait fermenter 5 kg de saccharose dissous dans 100 litres ; le milieu fermenté est neutralisé, distillé et la vinasse est concentrée sous reflux au volume d'un litre. Ce liquide contient donc la totalité des produits secondaires fixes de la fermentation de 5 kg de sucre. Ce n'est vraisemblablement pas à la présence de ce corps qu'est imputable l'erreur de la méthode MARIGNAN. Une ou plusieurs autres substances inconnues doivent intervenir.

II. — DOSAGE DES COMPOSÉS ACÉTOINIQUES

Nous nous sommes adressés pour ce dosage à la méthode d'HOOREMAN (46), basée sur la réaction classique de LEMOIGNE. L'acétoïne est transformée en diacétyle par oxydation par le chlorure ferrique et celui-ci est dosé, après son oximation, sous forme de diméthylglyoxime nickelique.

$$CH_3 - CHOH - CO - CH_3 \xrightarrow{O} CH_3 - CO - CO - CH_3$$

$$CH_3 - CO - CO - CH_3 \xrightarrow{NH_2OH,\ ClH} HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH$$

$$HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH \xrightarrow{Cl_2Ni\ +\ NH_4OH} (HON = C(CH_3) - C(CH_3) = NOH)_2NiO.$$

HOOREMAN a défini avec une grande précision les conditions dans lesquelles l'oxydation se fait avec un rendement constant de 94 p. 100 et mis au point un procédé de dosage colorimétrique très sensible pour le diacétyle.

Pour former le complexe nickelique soluble coloré en rouge, on tamponne par l'acétate d'ammonium et on doit se placer en milieu légèrement oxydant par addition de brome. On ajoute alors le sel de nickel et passe en milieu fortement ammoniacal. On mesure au photocolorimètre la coloration rouge obtenue et on rapporte à une droite d'étalonnage.

Cette méthode a dû être légèrement modifiée pour pouvoir être appliquée aux milieux riches en alcool. En effet, comme l'indique HOOREMAN, l'alcool à dose supérieure à 200 mg par litre gêne lors du dosage final. L'auteur fait remarquer que « les vins sont des milieux très complexes qui, par litre, contiennent environ 100 g d'éthanol et, au plus, 20 mg d'acétoïne seulement ; dans ces conditions la précision du dosage de l'acétoïne ne peut pas être très grande ».

Après plusieurs essais, nous avons constaté qu'il était possible de chasser très simplement l'alcool par rectification sous colonne à pointes, après la formation de la diméthylglyoxime, sans aucune perte de produit.

Hooreman a également proposé un dosage du 2,3-butanediol dans lequel ce corps est oxydé par le brome en acétoïne avec un rendement constant de 90 p. 100. Nous avons adapté cette méthode aux milieux riches en alcool et nous l'avons utilisée pour des dosages dans les eaux-de-vie. Mais pour les milieux fermentés, nous avons préféré employer la méthode Peynaud plus facile et plus rapide et qui s'applique directement sans dilution.

La sensibilité de la méthode colorimétrique est très grande : 0,1 mg de diméthylglyoxime dans 20 cm^3 donne une bonne lecture sur le tambour de l'électrophotomètre Meunier. Utilisant par la suite le diffuso-absorptiomètre Dognon, nous avons pu avoir une sensibilité encore supérieure. Or, il est toujours possible, grâce à la grande volatilité du diacétyle de le concentrer dans un volume très faible.

D'autre part la réaction a une grande spécificité ; seul le méthylglyoxal, exceptionnel d'ailleurs dans les milieux biologiques, donne, dans les conditions du dosage, une coloration rouge semblable à celle de la diméthylglyoxime nickelique. Mais on peut facilement éviter toute confusion avec le diacétyle car, par réduction avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, la coloration due au méthylglyoxal vire au jaune sans qu'il se forme de précipité ; la diméthylglyoxime nickelique au contraire, donne par réduction un précipité rouge de diméthylglyoxime nickeleuse (Hooreman).

Nous ne redonnerons pas ici les détails du mode opératoire, qui ont été publiés dans une étude des composés acétoïniques dans les eaux-de-vie (109), travail auquel nous renvoyons.

André et Dupuy (3) ont trouvé que la présence d'éthanal dans la prise d'essai provoque l'apparition d'un précipité de diméthylglyoxime nickeleuse et rend les résultats inexacts. Ils ont préféré utiliser la réaction colorée que donne le diacétyle avec l'α-naphtol et la créatine (ou la créatinine), suivant la méthode de Westerfeld (145).

Dans les milieux fermentés ou les eaux-de-vie que nous avons analysés suivant la méthode Hooreman, nous n'avons, pour notre part, jamais été gênés par l'éthanal.

D'autre part, la méthode de Westerfeld manque de spécificité. Si nous avons retrouvé parfaitement une addition connue de diacétyle, nous avons obtenu lorsqu'a été suivie par cette méthode la formation du diacétyle au cours de la fermentation, des chiffres très élevés, 100 à 120 mg par litre, alors que la méthode d'Hooreman indiquait des teneurs de l'ordre du mg. La réaction de Westerfeld est moins spécifique que celle d'Hooreman et en particulier, il apparaît qu'elle est inutilisable pour le dosage du diacétyle dans le cas des milieux en cours de fermentation.

Nous avons donc continué à appliquer la méthode d'Hooreman au dosage de l'acétoïne dans les milieux de fermentation en vue de l'établissement des bilans.

Cette méthode nous a également permis de rechercher et de doser le diacétyle et l'acétoïne dans un certain nombre de vins. Les résultats obtenus font l'objet du tableau III. Ils montrent qu'il existe dans tous les vins, de petites quantités de diacétyle, qui n'avaient pas été signalées avant nos premiers travaux.

TABLEAU III

Teneurs en composés acétoïniques des vins

Teneurs en mg par litre

	2,3-butanediol	Acétoïne	Diacétyle
Pauillac, 1950 :			
vin de goutte n° 1	612	7,8	0,5
vin de goutte n° 2	513	9,6	0,7
vin de presse n° 1	653	3,0	0,6
vin de presse n° 2	651	6,8	0,9
vin de presse n° 3	619	3,6	0,4
Médoc, 1950 :			
vin de goutte n° 1	601	11,6	0,9
vin de goutte n° 2	720	10,7	0,3
vin de presse n° 1	729	4,0	0,3
vin de presse n° 2	606	13,6	0,5
vin de presse n° 3	783	3,6	0,3
Pauillac, 1928	762	12,1	0,3
Margaux, 1950	535	7,6	0,4
Saint-Julien, 1950	492	2,0	0,4
Vin rouge d'Algérie :			
$13^{0}7$	1 260	15,2	1,6
$13^{0}9$	1 293	30,3	1,6
$14^{0}9$	1 485	84	1,8
Preignac n° 1, 1950	628	4,6	traces
Preignac n° 2, 1950	750	5,4	traces
Sauternes, 1950	828	5,2	traces

III. — DOSAGE DE L'ACIDE FORMIQUE ET DU FORMOL

Le principe du dosage de l'acide formique en présence d'acide acétique est basé sur la destruction de l'acide formique par oxydation dans des conditions telles que l'acide acétique n'est pas touché. Ces conditions ont été étudiées par POUX et OURNAC (113) pour l'oxydation periodique et par VERGNAUD (43) pour l'oxydation permanganique.

Nous avons mis au point le mode opératoire suivant : 20 cm³ du liquide fermenté sont soumis à un entraînement par la vapeur (après passage sous vide pour enlever le gaz carbonique) ; on recueille 600 cm³ de distillat qui contiennent la totalité des acides volatils de la prise d'essai. On titre à la soude N/10, soient *n* cm³ utilisés. On concentre alors à 20 cm³, on ajoute 1 cm³ de solution tampon à pH 7 concentrée (150 g de phosphate disodique et 33,5 g de phosphate monopotassique par litre) et 2 cm³ de permanganate de potassium en solution saturée, et on porte

10 minutes dans un bain-marie maintenu à 50°. Après refroidissement, on ajoute 2 ou 3 gouttes d'acide sulfurique pur et 2 ou 3 cm³ de sulfate ferreux en solution saturée. On passe à nouveau sous le vide d'une trompe à eau et on soumet à un nouvel entraînement à la vapeur en recueillant 400 cm³ de distillat. L'acide formique ayant été détruit, celui-ci ne contient que l'acide acétique de la prise d'essai. On titre par la soude N/10 ; soient n' cm³ utilisés.

Nous avons fait un essai à blanc pour déterminer la quantité de soude consommée par 400 cm³ de distillat dans ces conditions ; nous avons trouvé qu'il fallait retrancher 0,25 cm³ de la valeur n'.

$(n' - 0{,}25)$ nous permet de calculer l'acide acétique de la prise d'essai, et n l'acidité volatile totale ; l'acide formique s'obtient par différence.

La méthode de dosage utilisée pour le formol repose sur sa réaction colorée spécifique avec l'acide chromotropique.

25 cm³ de liquide fermenté sont soumis à l'entraînement par la vapeur et on recueille 50 cm³ de distillat. On effectue la réaction colorée sur 5 cm³ de ce distillat suivant le mode opératoire du dosage du glycérol. On ajoute 5 cm³ de réactif chromotropique (préparé extemporanément en mélangeant 5 cm³ d'une solution d'acide chromotropique à 5 g dans 100 cm³ d'eau distillée et 100 cm³ d'acide sulfurique pur). Après agitation, on porte 30 minutes au bain-marie bouillant. Puis on refroidit et on complète à 25 cm³. On détermine la densité optique et on rapporte à une courbe d'étalonnage.

CHAPITRE II

ÉTABLISSEMENT DES BILANS DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION AVEC DIVERSES LEVURES

Il est évident que la formation relative des différents produits secondaires par la levure est déterminée par la richesse de cette cellule en les enzymes responsables de leur élaboration. Ainsi des levures riches en aldéhydomutase forment beaucoup d'acide acétique, et la présence de grosses quantités d'acétoïne et de 2,3-butanediol signifie chez la levure un taux élevé d'enzyme de condensation butanediolique. On peut dire que la composition du liquide fermenté représente dans une certaine mesure la composition enzymatique de la levure et on peut tenter de baser sur ce critère une différenciation des levures.

Les classifications des levures reposent sur des propriétés morphologiques : caractères de la reproduction végétative, forme et taille des cellules, formation et forme des spores, aspect des cultures en milieu solide et colonies géantes, etc. On sait qu'on définit de cette façon trois grandes familles : Endomycetaceae, Sporobolomycetaceae et Cryptococcaceae, à l'intérieur desquelles on distingue des sous-familles, elles-mêmes divisées en tribus puis en genres. La considération des propriétés physiologiques telles que fermentation et assimilation des différents sucres, assimilation des nitrates, production de pigments, d'esters, d'acides, etc. intervient surtout pour différencier quelques espèces de levures dans un même genre.

Certains auteurs ont proposé d'ajouter à ces propriétés morphologiques et fermentatives une caractérisation des levures d'après leurs besoins vitaminiques ; la connaissance de ces besoins fournit un complément intéressant aux propriétés envisagées précédemment.

Il semble qu'une autre classification serait possible : celle qu'on établirait d'après les teneurs de chaque levure en chaque enzyme. Nos connaissances actuelles ne le permettent pas, mais la considération des produits secondaires formés paraît pouvoir servir de base à une différenciation physiologique qui, en dernière analyse, repose sur le système enzymatique de la levure. Cette différenciation interviendrait surtout dans le cadre de l'espèce.

En 1892, KAYSER (53) avait déjà essayé de classer les levures elliptiques d'après le taux de formation d'acides volatils ; mais cette pro-

duction varie aussi avec de nombreux autres facteurs et il en est de même pour la production du glycérol, de l'acide succinique et des autres produits secondaires. Laborde (64), Wortmann (147) avaient remarqué que le taux de glycérol varie avec la race de levure. Ventre (141) avait de même signalé en 1934 que les levures se différencient par la production de glycérol et d'acide acétique.

E. Peynaud et J. Ribéreau-Gayon (travaux déjà cités et en particulier 111), étudiant les *Saccharomyces ellipsoïdeus*, ont remarqué que les produits secondaires formés varient beaucoup d'une levure à l'autre et que les rapports entre certains de ces produits, tels que les rapports $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide succinique}}\left(\frac{a}{s}\right)$ et $\frac{\text{2,3-butanediol}}{\text{glycérol}}\left(\frac{b}{g}\right)$, permettent une classification en un certain nombre de groupes physiologiques. Cette classification se retrouve assez bien dans des milieux différents, bien que les valeurs des rapports changent.

Ces auteurs distinguent 6 groupes pour lesquels les valeurs des rapports sur jus de raisin sont les suivantes :

	$b/g < 7\ \%$	$b/g > 7\ \%$
	Glycérogènes	Glycologènes
$a/s < 0{,}75$	Succinogènes	
$0{,}75 < a/s < 1{,}25$	Équilibrées	
$a/s > 1{,}25$	Acétogènes	

Ils ont étudié sur ces bases un grand nombre de levures elliptiques de vins, pour lesquelles ils ont établi les bilans complets de fermentation.

Comme ce travail n'avait été fait que dans le cas particulier des *Saccharomyces ellipsoïdeus*, il nous a paru intéressant de l'étendre à un grand nombre de levures appartenant à d'autres genres et espèces : *Kloeckera, Hansenula, Torulopsis, Candida, Saccharomycodes, Hanseniaspora, Pichia,* etc.

Les souches nous ont été fournies par des laboratoires spécialisés dans l'étude des levures, notamment ceux de T. Castelli à Pérouse et le « Centraalbureau voor Schimmelcultures » à Delft. Un grand nombre de souches provient de la collection de la Station œnologique et ont été isolées des moûts et des vins de la Gironde (108).

Les levures à fort pouvoir fermentatif ont été étudiées sur moût de raisin de 14 à 16° Baumé, préalablement désulfité, alors que les levures moins alcoogènes *Kloeckera, Hansenula, Hanseniaspora,* etc., fermentaient sur moût de raisin dilué à 6 ou 7° Baumé et conservé par pasteurisation. Les milieux étaient ensemencés à l'aide d'une culture de levures en milieu liquide de façon à amener le taux de levures à 100 cel-

lules par mm^3. Ces levures sont conservées au laboratoire et repiquées tous les deux mois alternativement sur milieu solide (moût de bière amené à pH 7 et additionné de 20 grammes par litre de gélose) et sur milieu liquide constitué par du moût de raisin stérilisé.

Les fermentations ont toujours été conduites dans deux conditions d'aération (118). Dans un cas, le moût était mis à fermenter dans des flacons bouchés d'un tampon d'ouate assez serré ; l'ouate permet la pénétration de l'air et réalise des conditions d'aérobiose ménagée permettant le développement actif des levures. Dans l'autre cas, des flacons identiques étaient bouchés par un bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube de verre finement effilé à son extrémité supérieure et rempli d'ouate dans sa partie large. De cette façon, le gaz carbonique de fermentation s'accumule dans la partie supérieure du flacon et le gaz qui s'échappe de manière continue par le tube effilé, empêche toute pénétration d'air. La fermentation se poursuit en anaérobiose, du moins tant que le dégagement du gaz carbonique est suffisant. Avec certaines levures, telles que les *Torulopsis* et les *Hansenula* qui fermentent lentement, la rentrée d'air est suffisante pour permettre des phénomènes oxydatifs ; il n'y a plus anaérobiose complète.

Les fermentations avaient lieu dans une étuve maintenue à 25°-26°C et duraient un mois environ. Après ce temps, on dosait les produits secondaires dans le liquide séparé du dépôt par décantation.

Les résultats obtenus, dont quelques-uns ont été déjà publiés (110), nous ont permis de dresser les tableaux IV, V et VI. Plusieurs dizaines de bilans ayant été ainsi établis, nous ne pouvons en donner que quelques exemples. Dans ces tableaux, mis à part le degré alcoolique exprimé en volume, les chiffres représentent des millimolécules par litre, expression qui permet l'addition directe des produits secondaires pour le calcul des bilans.

I. — ÉTUDE DES SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS

Les dix levures appartenant à l'espèce *Saccharomyces ellipsoïdeus* que nous avons étudiées, confirment les résultats obtenus par Genevois, Peynaud et Ribéreau-Gayon. Le bilan des produits secondaires donne un rapport Σ/g de l'ordre de 0,8 à 0,9 avec des extrêmes de 0,79 et 0,98. On peut donc dire qu'on connaît les produits secondaires que forment ces levures à 10 p. 100 près ou, dans les conditions les moins bonnes, à 20 p. 100 près. Les taux de chacun de ces produits sont variables d'une levure à l'autre et avec les conditions d'aération. Ainsi, en présence d'air il se forme davantage d'acide succinique, d'acétoïne et généralement de glycérol ; par contre, il y a plus d'acide acétique en milieu non aéré.

La fermentation va généralement plus loin en présence d'air ; il se fait davantage d'alcool en milieu aéré. Cette différence est très forte pour la levure 81 qui donne 15°1 en aérobiose et 8°1 seulement en flacon bouché d'un tube effilé. Par contre, la levure 89 est capable de former autant d'alcool dans les deux conditions.

Lorsqu'on calcule le rendement en alcool à partir du sucre, on trouve qu'il a fallu en moyenne 18 g de sucre pour former un degré d'alcool ; c'est un rendement faible, peut-être dû à la grande richesse en sucre du moût au départ.

Le rendement en alcool dépend évidemment de la proportion de la fermentation glycéropyruvique ; on peut représenter cette proportion par le rapport $x = \frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$, ces produits étant exprimés en millimolécules. Ceci signifie que sur 100 mmol de sucre fermenté, x mmol subissent la fermentation glycéropyruvique. On trouve pour ces levures elliptiques des proportions variant de 5 à 13 p. 100, les chiffres les plus courants étant aux environs de 7,5 p. 100. La quantité de sucre fermenté influe beaucoup sur ce rapport et il est d'autant plus grand qu'il y a moins de sucre fermenté. Par exemple, la fermentation glycéropyruvique apparaît proportionnellement plus importante à l'abri de l'air qu'à l'air ; ceci est logique puisque la plus grande partie du glycérol se forme pendant la phase d'induction de la fermentation alcoolique.

Nous avons calculé pour ces levures les rapports a/s et $(b + m)/g$, afin de leur appliquer la classification schématisée par le tableau de la page 32.

Nous trouvons comme levure succinogène-glycérogène la levure n° 81, toutes les autres levures du tableau IV se classant comme levures acétogènes et glycologènes. La première est donc riche en enzyme de condensation succinique, mais pauvre en la diastase responsable de la condensation acétoïnique. Les autres ont au contraire relativement beaucoup d'aldéhydomutase qui conditionne la formation d'acide acétique.

Cette classification a, bien entendu, une grande part d'arbitraire, puisque ces rapports varient avec le milieu et les conditions de fermentation. Par exemple, l'aération diminue l'acide acétique et augmente l'acide succinique, vraisemblablement du reste en modifiant le taux de l'enzyme de condensation succinique.

Les *Saccharomyces ellipsoïdeus* se caractérisent donc par un métabolisme de fermentation ($\Sigma/g < 1$). D'autre part, ils engagent à peu près tous la même proportion de sucre dans la voie glycéropyruvique et se différencient surtout par leur utilisation de l'éthanal formé.

Tableau IV

Bilans des produits secondaires avec divers Saccharomyces ellipsoïdeus

Teneurs en mmol par litre. Moût de raisin : 16° Baumé

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	2,3 butanediol b	Acétoïne m	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1 000 $(b+m)/g$	g sucre fermenté
81 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°1	*123*	5,1	18,3	8,2	0,5	1,2	*112*	91	28	67	7,6
Geisenheim I	abri de l'air	8°1	*126*	13,0	13,1	2,8	0,08	3,5	*100*	80	100	22	13,0
89 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	13°8	*93*	13,7	8,5	0,6	0,4	1,8	*82*	88	161	103	6,5
Geisenheim II	abri de l'air	13°7	*77*	15,0	0,1	9,6	0,18	2,8	*74*	96	255	124	5,9
90 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°7	*114*	23,3	6,9	13,3	0,69	2,1	*98*	86	337	116	7,2
Tokay	abri de l'air	13°3	*111*	24,5	5,7	10,4	0,2	3,5	*92*	83	430	94	8,5
70 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°0	*89*	15,5	6,7	7,9	0,2	2,9	*76*	85	232	88	5,7
Portugal	abri de l'air	11°8	*85*	22,5	5,0	7,2	0,1	5,8	*83*	98	450	84	7,6
73 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	15°0	*96*	14,9	7,0	8,1	0,2	2,7	*76*	79	212	84	6,2
Australie	abri de l'air	11°5	*95*	22,5	5,6	7,4	0,08	4,5	*85*	88	402	78	8,6
74 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°7	*87*	17,8	5,9	12,0	0,27	2,5	*80*	82	302	137	5,8
Australie	abri de l'air	12°2	*114*	28,6	4,9	11,6	0,4	4,3	*98*	86	583	102	9,8
171 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°0	*104*	19,2	6,2	9,7	0,2	2,6	*82*	79	309	93	7,1
Australie	abri de l'air	11°0	*93*	24,5	4,9	8,0	0,1	4,2	*86*	92	500	86	9,0
175 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	13°9	*95*	20,4	5,7	7,9	0,16	3,0	*80*	85	358	83	6,6
Australie	abri de l'air	13°0	*94*	24,5	4,8	7,4	0,1	4,7	*85*	90	510	79	7,9
177 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°4	*95*	14,9	7,3	8,9	0,16	2,4	*78*	82	204	93	6,2
Australie	abri de l'air	12°1	*95*	20,4	6,4	8,7	0,1	4,5	*86*	91	318	91	8,2
228 *Sacch. ellipsoïdeus*	air	14°5	*95*	20,4	7,0	10,3	0,14	2,9	*89*	94	291	108	6,4
Australie	abri de l'air	12°2	*86*	22,5	4,7	8,3	0,1	4,2	*81*	94	478	96	7,8

Le nombre précédant le nom de la levure est le numéro d'ordre de la collection. La somme Σ est calculée d'après la formule : $\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m$.

Tableau V

Bilans des produits secondaires avec diverses levures.

Teneurs en mmol par litre. Moûts de raisin : 14°5 et 16° Baumé.

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 butanediol *b*	Acétoïne *m*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*	*g* / sucre fermenté
125 *Sacch. italicus*	air	14°1	*90*	8,8	8,6	4,8	1,3	1,2	*69*	76	102	67	6,1
	abri de l'air	12°1	*64*	8,4	6,1	4,3	0,5	1,2	*54*	84	137	76	5,3
126 *Sacch. oviformis*....	air	11°7	*100*	14,1	7,3	5,7	0,9	1,4	*74*	74	193	66	8,2
	abri de l'air	9°6	*70*	15,3	6,8	5,9	0,8	1,6	*74*	104	225	96	7,1
127 *Sacch. carlsbergensis*	air	9°1	*66*	9,0	7,2	4,4	0,7	1,5	*61*	92	125	77	6,7
	abri de l'air	6°8	*56*	9,6	4,6	3,1	0,5	1,6	*48*	85	208	64	7,6
128 *Sacch. pastorianus*..	air	7°5	*68*	13,1	5,3	7,5	1,4	1,7	*65*	96	247	130	8,0
	abri de l'air	5°8	*56*	11,4	4,2	5,2	1,9	3,1	*56*	100	270	126	8,7
129 *Sacch. uvarum*	air	9°1	*86*	8,4	9,8	8,2	0,7	1,3	*77*	90	85	104	8,6
	abri de l'air	7°1	*72*	12,0	5,7	7,2	3,3	3,8	*70*	97	210	148	9,1
99 *Saccharomycodes bisporus*	air	13°5	*132*	18,8	10,5	9,0	1,1	4,3	*106*	80	178	76	9,1
	abri de l'air	10°6	*89*	11,5	9,5	3,0	2,4	2,2	*80*	90	121	60	9,3
100 *Saccharomycodes ludwigii*	air	10°7	*99*	11,0	10,2	3,4	4,2	1,2	*78*	79	116	77	8,4
	abri de l'air	10°7	*84*	10,8	10,5	2,7	3,1	2,3	*79*	94	102	69	8,6
87 *Zygosaccharomyces polymorphus*	air	12°9	*96*	13,7	8,6	9,6	4,1	1,5	*82*	86	159	143	6,8
	abri de l'air	14°3	*97*	18,4	8,2	7,6	1,0	4,4	*90*	93	224	88	6,9
101 *Torulaspora rosei* ..	air	11°0	*85*	10,1	6,9	8,6	0,2	3,7	*67*	79	146	103	7,2
	abri de l'air	12°7	*85*	10,9	5,7	4,4	0,1	4,3	*59*	70	191	52	7,0
130 *Torulaspora delbrueckii*	air	9°2	*67*	2,0	10,9	5,1	1,4	1,8	*67*	99	19	97	6,4
	abri de l'air	4°3	*49*	1,2	6,5	2,6	1,3	0,8	*41*	85	19	80	8,3
85 *Torulaspora lactis* (1)	air	8°0	*50*	21,0	5,2	6,5	0,1	1,8	*76*	153		132	5,7
	abri de l'air	5°1	*52*	14,7	6,2	3,3	0,1	4,4	*68*	131		63	8,2
88 *Torulopsis Meissner* (1).	air	12°9	*100*	36,2	7,1	14,9	0,5	2,7	*126*	126		154	7,1
	abri de l'air	9°5	*111*	47,0	6,4	8,7	0,2	6,5	*142*	127		80	10,2

Tableau VI

Bilans des produits secondaires avec diverses levures (Suite).

Moûts de raisin : 6° et 6°8 Baumé — Teneurs en mmol par litre.

Levures	Conditions	Alcool	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	2,3-butanediol b	Acétoïne m	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1 000 $(b+m)/g$	$\frac{g}{\text{sucre fermenté}}$
83 *Kloeckera apiculata*(1)	air	5°1	*59*	4,9	5,5	1,8	0,1	7,7	*47*	80	89	31	10,2
Geisenheim I	abri de l'air	5°7	*47*	4,9	3,9	1,2	0,1	3,2	*34*	72	125	25	8,2
84 *Kloeckera apiculata*(1)	air	5°0	*58*	5,5	5,5	1,9	0,1	7,3	*48*	83	100	33	10,1
Geisenheim II	abri de l'air	5°7	*49*	4,7	4,5	1,1	0,1	2,5	*36*	71	104	17	8,5
103 *Kloeckera apiculata*	air	6°1	*47*	36,8	5,5	3,2	0,2	5,1	*110*	234		72	7,3
Pouilles	abri de l'air	6°8	*56*	9,9	4,3	2,0	0,2	3,9	*48*	85	230	39	8,3
104 *Kloeckera africana* .	air	6°1	*66*	20,3	7,5	3,6	2,1	7,2	*93*	141		86	10,0
	abri de l'air	4°2	*64*	16,9	4,4	1,0	1,0	2,3	*53*	83	384	31	13,5
102 *Kloeckera magna* ...	air	5°6	*62*	51,0	6,3	3,0	3,3	4,3	*147*	238		101	9,8
	abri de l'air	6°7	*62*	13,8	5,9	3,3	0,1	4,4	*60*	96	234	54	9,2
136 *Kloeckeraspora uvarum*	air	3°6	*58*	23,7	4,0	1,6	2,2	0,8	*74*	128		65	13,0
	abri de l'air	3°4	*54*	15,3	3,8	1,2	1,7	1,1	*55*	103	400	53	12,8
106 *Hanseniaspora apuliensis*	air	6°0	*69*	26,5	5,9	4,4	0,6	7,7	*96*	139		72	10,3
	abri de l'air	6°2	*77*	12,1	4,5	2,3	0,4	7,2	*57*	74	268	35	11,5
107 *Hanseniaspora guilliermondii*.....	air	5°8	*53*	18,1	5,4	1,0	2,7	4,4	*74*	139		67	9,8
	abri de l'air	6°1	*89*	19,2	5,6	2,6	1,1	3,5	*75*	83	342	41	12,8
112 *Hansenula nivea*....	air	1°4	*23*	74,3	3,9	1,5	0,1	0,5	*170*	740		69	4,1
	abri de l'air	3°3	*17*	69,0	3,9	2,5	0,2	0,5	*161*	945		158	4,5
113 *Hansenula fermentans*	air	0°9	*32*	70,1	5,9	1,6	0,1	0,3	*172*	537		54	5,8
	abri de l'air	4°0	*27*	43,8	4,5	1,6	0,1	0,4	*112*	416		62	5,6

Le nombre précédant le nom de la levure est le numéro d'ordre de la collection. La somme Σ est calculée d'après la formule :

$$\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m.$$

(1) Cette levure nous a été fournie sous cette dénomination par le Professeur Schanderl de Geisenheim.

II. — ÉTUDE DES LEVURES APPARTENANT A D'AUTRES GENRES

Les résultats obtenus avec les autres genres de levures, mises en œuvre dans les conditions expérimentales qui ont été décrites (milieu, température, aération), permettent de les classer en deux groupes :

1° Les levures qui, de même que les *Saccharomyces ellipsoïdeus*, satisfont au bilan des produits secondaires (nous le constatons dans les deux conditions d'aération) et pour lesquelles le rapport Σ/g est de l'ordre de 0,8 à 0,9. Nous trouvons dans ce groupe tous les *Saccharomyces*, en plus des *Saccharomyces ellipsoïdeus*, ainsi que *Saccharomycodes bisporus* et *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces polymorphus*, *Torulaspora rosei* et *Torulaspora delbrueckii*, les deux levures 83 et 84 étiquetées *Kloeckera apiculata* I et II (les cultures de ces deux levures n'ont pas toujours la forme apiculée et elles donnent beaucoup moins d'acidité volatile que les autres *Kloeckera*).

Toutes ces levures ont, comme les levures elliptiques, un métabolisme fermentatif.

2° Les levures pour lesquelles le bilan des produits secondaires n'est pas correct. On le constate dans les deux conditions d'aération ; même dans les flacons fermés par des bouchons à tube effilé, une très légère pénétration d'air intervient lorsque la fermentation est lente. Σ est ici toujours très supérieur à g. Ce sont *Torulaspora lactis*, *Torulopsis Meissner*, *Hansenula nivea*, assimilée par Lodder à *Hansenula anomala*, *Hansenula fermentans*.

La *Torulaspora* et la *Torulopsis* peuvent former une assez grande quantité d'alcool, jusqu'à 12°9 pour *Torulopsis Meissner* ; les *Hansenula* au contraire, ne forment des quantités appréciables d'alcool qu'à l'abri de l'air et illustrent la remarque de Meyerhof (75) : « L'intensité de fermentation aérobie est d'autant plus inférieure à l'intensité de fermentation anaérobie que la levure est plus riche en ferment respiratoire. » Elles forment des quantités importantes d'acide acétique, qui n'est pas entièrement d'origine fermentative. Il y a en même temps respiration et intervention des déhydrases oxytropes, des oxydases et des cytochromes. Le bilan des produits secondaires n'est plus correct, car ces produits ne sont plus formés alors par la seule fermentation

Entre ces deux groupes bien caractérisés se situent des levures qui vérifient le bilan des produits secondaires en anaérobiose (d'ailleurs relative nous le savons) et ne le vérifient plus en milieu aéré. Ce groupe comprend toutes les *Kloeckera* (sauf les n° 83 et 84), *Kloeckeraspora uvarum* et les *Hanseniaspora*. Au contact de l'air elles forment de l'acide acétique par voie oxydative. A l'abri de l'air, elles sont uniquement fermentatives. Elles ont un pouvoir alcoogène assez faible.

Nous avons donc distingué les levures d'après les intensités respectives de la fermentation et de la respiration, et nous avons vu que l'inten-

sité respiratoire est très variable d'une levure à l'autre. En d'autres termes, certaines levures sont nettement plus riches en enzymes respiratoires. Les expériences d'Ephrussi et Slonimski tendent à rapprocher ces enzymes des enzymes adaptatifs et remettent en question leur caractère d'enzymes constitutifs typiques. En l'absence d'enzyme respiratoire, la fermentation aérobie peut être aussi forte que la fermentation anaérobie ; en effet Slonimski et Hirsch (131) ont montré qu'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* caractérisé par l'absence complète de respiration sensible au cyanure de potassium, présente une fermentation aérobie aussi forte que la fermentation anaérobie et est dépourvu des cytochromes a et b, de la cytochrome-oxydase et de la déshydrogénase succinique. Presque tous les enzymes respiratoires ont été affectés par la mutation.

Ce sont donc la présence et le taux des enzymes respiratoires présents chez chaque race de levure qui conditionnent la part de la respiration, donc en définitive la composition du liquide fermenté.

Remarque. — Certains auteurs ont fait remarquer que les levures apiculées avaient un rendement en alcool inférieur à celui des levures elliptiques, puisqu'il leur faut 21 et 22 g de sucre pour former un degré d'alcool ; ceci signifierait qu'elles engagent une plus forte proportion de sucre dans la fermentation glycéropyruvique. Or, nous trouvons ici des chiffres du même ordre que pour les levures elliptiques, si nous prenons soin de faire fermenter ces levures à l'abri de l'air et de faire la comparaison au même degré d'alcool formé. En effet, le taux de la fermentation glycéropyruvique est d'autant plus élevé, donc le rendement en alcool est d'autant plus faible, qu'il y a moins de sucre fermenté. Si l'on tient compte de ce facteur, on constate que le taux de la fermentation glycéropyruvique varie très peu d'une levure à l'autre quel qu'en soit le genre. Les levures apiculées ne montrent un rendement en alcool plus faible que parce qu'elles sont moins alcoogènes.

Ainsi toutes les levures fermentent environ la même proportion de sucre suivant le schéma de Gay-Lussac et suivant le schéma de Neuberg. Mais elles se différencient surtout par l'utilisation qu'elles font de l'éthanal, comme l'exprime la considération des rapports a/s et b/g.

Rapports a/s et b/g. Si l'on veut calculer pour ces levures les rapports a/s et b/g, il faut dans le cas des levures à métabolisme oxydatif faire la discrimination entre l'acide acétique de fermentation et l'acide acétique de respiration. On peut avoir une idée de l'ordre de grandeur du premier par le calcul suivant. De la formule $5s + 2a_f + b + h + 2m = \Sigma = 0{,}9\ g$, on déduit la valeur de a_f :

$$a_f = \frac{\Sigma - (5s + b + 2m + h)}{2}$$

$$a_f = \frac{0{,}9g - (5s + b + h + 2m)}{2}$$

Appliqués aux données analytiques des tableaux V et VI, ces calculs donnent les résultats du tableau VII.

On trouve pour les *Hansenula* 5*s* égal ou supérieur à *g* ; il faut donc

TABLEAU VII

Calcul de l'acide acétique de fermentation formé par les levures oxydatives

Teneurs en mmol par litre

	Conditions de fermentation	Acide acétique total	Acide acétique de fermentation	Acide acétique de respiration	100 *a/s*
85 *Torulaspora lactis*..	air	21,0	5,2	15,8	100
	abri de l'air	14,7	4,0	10,7	65
88 *Torulopsis Meissner*	air	36,2	22,9	13,3	323
	abri de l'air	47,0	26,1	20,9	408
112 *Hansenula nivea* .	air	74,3	0	74,3	—
	abri de l'air	69,0	0	69,0	—
113 *Hansenula fermentans*.....	air	70,1	0	70,1	—
	abri de l'air	43,8	0	43,8	—
103 *Kloeckera apiculata*	air	36,8	3,0	33,8	55
104 *Kloeckera africana*.	air	20,3	3,2	17,1	43
102 *Kloeckera magna*..	air	51,0	8,3	42,7	132
136 *Kloeckeraspora uvarum*.....	air	23,7	12,7	11,0	317
106 *Hanseniaspora apuliensis*	air	26,5	12,1	14,4	205
107 *Hanseniaspora guillermondii*	air	18,1	4,9	13,2	91

nécessairement admettre que dans ce cas, il y a une formation d'acide succinique par oxydation :

$$2CH_3COOH \xrightarrow{O} COOH - CH_2 - CH_2 - COOH + H_2O.$$

L'acide acétique de fermentation calculé ci-dessus est en général assez faible et de l'ordre de grandeur du taux formé habituellement par les levures elliptiques. On ne peut donc pas dire en règle générale que l'intervention des apiculées se distingue de celle des elliptiques par une acidité volatile plus élevée. Il faut également faire ici la même remarque qu'en ce qui concerne le taux de fermentation glycéropyruvique : la plus grande partie de l'acide acétique se forme avec les 4 ou 5 premiers degrés d'alcool et on doit en tenir compte dans la comparaison.

ANTONIANI avait déjà mesuré pour les *Kloeckera*, l'acide acétique de fermentation en inhibant la respiration par le cyanure de potassium (7). Il trouvait également que l'acide acétique de dismutation est du même ordre de grandeur que pour les *Saccharomyces* et en concluait que la

formation d'acide acétique d'origine oxydative est une propriété caractéristique de certaines levures non elliptiques.

Le calcul des rapports *a/s* et *b/g* pour toutes ces races de levures nous donne le classement suivant, en envisageant seulement les fermentations conduites dans les conditions les plus anaérobies.

	Succinogènes	Équilibrées	Acétogènes
Glycérogènes	*Torulaspora lactis*	*Sacch. italicus* *K. apiculata 83* *K. apiculata 84* *Sacch. ludwigii*	*Sacch. carlsbergensis* *Kloeckeraspora uvarum* *Saccharomycodes bisporus* *Torulaspora rosei* *K. apiculata 103* *K. africana* *K. magna* *Hanseniaspora apuliensis* *Hanseniaspora guillermondii*
Glycologènes	*Torulaspora delbrueckii*		*Sacch. pastorianus* *Sacch. uvarum* *Sacch. oviformis* *Zygo. polymorphus* *Torulopsis Meissner*

On remarquera cependant que ces rapports varient beaucoup avec les conditions de fermentation et qu'ils ne constituent pas une base rigoureuse de classification. Les conditions d'aération modifient profondément le stock enzymatique de la levure. Ceci est en accord avec les travaux d'Ephrussi et Slonimski (130) qui ont montré sur *Saccharomyces cerevisiae* que la modification des conditions d'aération introduit des variations qualitatives et quantitatives très importantes, non seulement du système des enzymes respiratoires, mais aussi des autres diastases.

III. — LA CLASSIFICATION D'ANTONIANI

Un autre mode de classification a été proposé par Antoniani qui répartit les levures en trois groupes d'après leur « pouvoir ferment », défini comme « l'aptitude de la levure à dégrader la molécule glucidique exclusivement par une activité déshydrogénante anaérobie, sans aucune aide énergétique d'un processus oxydatif du type respiratoire, impliquant une intervention finale d'oxygène libre » (5). Il prend comme critère de mesure du « pouvoir ferment » l'intensité respiratoire, le potentiel d'oxydoréduction et la formation d'acétoïne ou de 2,3-butanediol. Il distingue ainsi : 1° les levures à bas pouvoir ferment, à forte intensité respiratoire, qui travaillent à un potentiel élevé et accumulent exclusivement de l'acétoïne ; 2° les levures à haut pouvoir ferment dont l'intensité respiratoire est faible, qui travaillent à un potentiel bas et forment

uniquement du butanediol ; 3° les levures plus rares à pouvoir ferment moyen caractérisées par la présence simultanée d'acétoïne et de 2,3 butanediol.

Nous constatons que toutes les levures que nous avons essayées forment simultanément de l'acétoïne et du 2,3-butanediol en proportions d'ailleurs très différentes. Ceci a été confirmé par André et Dupuy (4). Si on les sépare en deux groupes d'après le pourcentage d'acétoïne qu'elles forment par rapport à la somme 2,3 butanediol-acétoïne, on retrouve dans les grandes lignes les résultats d'Antoniani (6), mais il n'y a pas forcément une relation entre la formation d'acétoïne et l'intensité de la respiration ; ainsi les *Torulopsis* à forte intensité respiratoire ne forment que 2 à 3 p. 100 d'acétoïne ; au contraire, les *Saccharomycodes* à faible intensité respiratoire donnent beaucoup d'acétoïne. La corrélation entre la production d'acétoïne et d'acide acétique signalée par Castelli dans deux publications (16) n'est pas non plus générale et comme il l'a noté lui-même, cette corrélation n'existe pas pour toutes les races.

Nous consacrons le chapitre VII à l'étude de la formation des corps butanedioliques. Notons seulement ici qu'il ne paraît pas possible d'utiliser leur présence comme une base de classification rigoureuse des levures, de même qu'il est difficile de relier la teneur en l'un de ces corps au potentiel d'oxydoréduction du liquide ou au taux d'un autre produit.

IV. — CONCLUSIONS

En définitive, si la connaissance du taux des produits secondaires formés par une levure permet d'envisager un classement, ce taux est la plupart du temps trop variable suivant les milieux et les conditions pour que cette classification ait la valeur des tests physiologiques habituels. Elle ne peut guère s'appliquer qu'à la notion de race dans le cadre de l'espèce, et comme l'expriment E. Peynaud et S. Domercq (108) : « Si l'on peut baser une classification physiologique sur la présence ou l'absence de tel enzyme (invertase, α galactosidase, par exemple, permettant à la levure l'utilisation d'un sucre donné), il est difficile d'envisager une classification reposant sur le taux d'un enzyme (ferment respiratoire, enzyme de condensation de l'acide succinique ou butanediolique), car ce taux est également fonction du milieu et des conditions de travail de la levure. »

Il n'en reste pas moins que la connaissance des taux de formation des produits secondaires par une levure présente un grand intérêt pour sa caractérisation et que la description d'une levure devrait s'accompagner de ces données.

En ce qui concerne la façon dont les diverses levures transforment le sucre par voie fermentative, les présents documents analytiques aboutissent à la notion d'une certaine unité.

Chapitre III

INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

On a reconnu depuis longtemps que la formation des différents produits secondaires était affectée par les conditions de la fermentation. Nous avons donc entrepris l'étude systématique de l'influence de chacune de ces conditions, conditions extérieures et conditions de milieu, et nous avons fait varier successivement : l'aération, la concentration en ions hydrogène, la température, la nature du milieu, la teneur en facteurs de croissance, la richesse en sucre ; nous avons également étudié l'action d'un activeur de fermentation d'origine fongique.

I. — INFLUENCE DE L'AÉRATION

Nous avons déterminé les modifications apportées par l'aération à la formation des produits secondaires avec deux *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Ces levures ont fermenté un moût de raisin de 12° Baumé dans une étuve à 26°C. Les dispositifs d'obturation employés et les différentes conditions d'aération ont été les suivants :

a) Bouchon de liège paraffiné traversé par un tube de verre coudé plongeant dans le mercure ; dans ces conditions, la pénétration d'air est impossible.

b) Bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube de verre finement effilé à son extrémité supérieure et bourré d'ouate dans sa partie large. Le dégagement du gaz par le tube effilé empêche la pénétration d'air au moins pendant la phase la plus active de la fermentation.

c) Tampon d'ouate réalisant des conditions d'aérobiose ménagée.

d) Tampon d'ouate et aération quotidienne par agitation pendant une minute en présence d'air.

e) Tampon d'ouate et barbotage quotidien d'oxygène pendant une heure.

Il n'est pas possible de chiffrer exactement les consommations d'oxygène dans ces différentes conditions, mais on a ainsi réalisé une gamme d'aération d'intensité croissante.

A la fin de la fermentation on a décanté le liquide et on a dosé les produits secondaires. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VIII.

Tableau VIII

Influence de l'aération sur la formation des produits secondaires.

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g.

	Conditions d'aération	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
81. *Sacch. ellipsoïdeus* Geisenheim	Barboteur	10°4	*79*	11,6	6,9	0,6	7,9	0,8	*68*	86	168	108
	Tube effilé	10°8	*74*	8,6	6,0	0,5	6,1	1,4	*56*	76	143	89
	Ouate	12°0	*84*	7,5	8,9	0,5	6,1	1,2	*68*	81	84	79
	Aération	12°0	*90*	7,3	9,6	0,4	6,1	1,6	*71*	79	76	72
	Barbotage d'oxygène	12°0	*88*	6,7	9,5	0,5	6,2	1,2	*69*	79	70	76
41. *Sacch. ellipsoïdeus* Sauternes	Barboteur	8°8	*72*	16,1	4,9	0,8	5,9	0,8	*65*	91	328	93
	Tube effilé	11°4	*71*	16,7	5,6	0,6	5,4	0,7	*69*	97	298	84
	Ouate	11°9	*79*	9,4	8,4	0,6	4,6	1,3	*68*	86	112	66
	Aération	12°1	*83*	10,6	9,3	0,6	5,2	3,5	*78*	94	114	70
	Barbotage d'oxygène	11°8	*80*	10,0	9,5	0,5	4,8	3,0	*76*	95	105	66

Le calcul de la somme $\Sigma = 5s + 2a + b + h + 2m$ nous montre que la relation $\Sigma = 0{,}8$ à $0{,}9$ g se vérifie de manière satisfaisante dans tous les cas. Même en milieu aéré le métabolisme reste uniquement fermentatif et il n'y a pas intervention des diastases d'oxydation.

La fermentation du sucre va toujours nettement plus loin en présence d'air et il se forme davantage d'alcool. Il se fait aussi toujours davantage de glycérol en milieu aéré, mais le rapport $\frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$ qui représente la proportion de la fermentation glycéropyruvique, ne varie pas beaucoup. L'aération a finalement peu d'incidence sur la proportion de sucre qui suit la voie de la transformation glycéropyruvique.

La production d'acide succinique est toujours nettement augmentée par l'aération, alors que le taux d'acide acétique est au contraire diminué, sans qu'il soit possible d'ailleurs d'établir une relation quantitative entre ces variations opposées. Les modifications des teneurs en enzymes avec les conditions d'aération, auxquelles il a été fait allusion dans le chapitre précédent, par un phénomène analogue à celui qui a été mis en évidence par Slonimski (130), sont certainement responsables des variations dans les teneurs en produits secondaires.

Cet auteur a montré par exemple que la teneur en cytochrome-oxydase ou en déshydrogénase lactique est diminuée plusieurs centaines de fois dans la fermentation anaérobie. La présence d'oxygène induit la synthèse de ces enzymes et à des états d'aération intermédiaires correspondent des compositions enzymatiques intermédiaires. On pourrait ainsi expliquer, par analogie, l'augmentation du taux d'acide succinique formé, constatée en milieu aéré, par la formation plus importante chez la levure aérée de l'enzyme qui provoque la condensation de l'éthanal en acide succinique.

La formation plus élevée d'acide acétique à l'abri complet de l'air est en opposition avec la thèse selon laquelle l'acide acétique de fermentation se formerait uniquement par oxydation de l'alcool par les déshydrogénases de la levure (49).

La teneur en produits acétoïniques se montre légèrement plus forte en anaérobiose, mais nous n'observons pas une variation systématique de l'acétoïne. Cependant, Stahly et Werkman (132) ont suggéré qu'acétoïne et 2,3-butanediol forment un système réversible d'oxydoréduction. Nous reviendrons d'ailleurs dans le chapitre VII sur le cas des produits butanedioliques.

L'aération en cours de fermentation est donc un des facteurs importants agissant sur la formation des produits secondaires. Même pour des levures présentant de faibles intensités respiratoires, la plus ou moins grande aération du milieu a sa répercussion sur l'utilisation de l'éthanal par la levure. Tout incline à penser que la levure se multipliant au con-

tact de l'air possède un stock enzymatique beaucoup plus abondant que celle qui végète à l'abri complet de l'oxygène. Le taux des produits secondaires formés, sinon le taux de la fermentation glycéropyruvique, est donc assez profondément modifié suivant l'importance de l'aération du milieu qui fermente.

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS H^+

Straub (134) et Laborde avaient remarqué que l'acidité de la solution nutritive exerçait une influence sur la production de glycérol. Straub indiquait que le glycérol augmente quand l'acidité diminue, Laborde trouvait au contraire que la proportion de glycérol augmente avec l'acidité. Mais ces auteurs envisageaient seulement l'acidité de titration et ne pouvaient faire appel à la notion d'acidité réelle, inconnue à cette époque.

On a vu que Neuberg et ses collaborateurs ayant observé que la fermentation était profondément modifiée en milieu alcalin et qu'il se formait davantage d'acide acétique et de glycérol, avaient expliqué ces modifications par l'existence d'une fermentation glycéroacétique du sucre, dont la proportion augmente quand le pH s'élève.

E. Peynaud (103) a étudié plus particulièrement la production d'acide acétique en fonction du pH et montré qu'elle passe par un minimum aux environs de pH 3,5 — 4,5 pour devenir une fonction linéaire du sucre fermenté vers pH 7,5.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier les variations de tous les produits secondaires avec la concentration en ions H^+ et de voir si l'équation de Genevois se vérifiait aussi en milieu très acide ou très alcalin (67).

Nous avons fait fermenter à 25°C un moût de raisin de 12° Baumé dans les deux conditions d'aération habituelles : obturation par l'ouate et par un tube effilé suivant le dispositif déjà décrit. Dans cette expérience et dans les suivantes, nous avons utilisé une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus* ; dans ce cas, la fermentation est active et nos techniques expérimentales correspondent à des conditions nettement distinctes d'aérobiose et d'anaérobiose. Nous pourrons donc employer ces termes dans l'étude qui suit.

Nos essais ont porté sur six conditions différentes de pH : 2,6 ; 3,0 ; 5,0 ; 5,65 (obtenu par addition de carbonate de calcium) ; 7,0 et 8,0, ces deux dernières valeurs étant maintenues par additions répétées de solution de soude au cours de la fermentation.

Le tableau IX expose les résultats obtenus. Nous constatons que la concentration en ions hydrogène a une grande influence sur la formation de tous les produits secondaires et aussi sur l'allure de la fermentation. C'est aux pH acides, généralement vers pH 3,0 que la production d'alcool

Tableau IX

Influence du pH sur la formation des produits secondaires

Moût de 12° B fermenté par *Sacch. ellipsoïdeus* n° 41

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g.

pH initial	pH final	Sucre restant	Alcool	Alcool total	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
						Aérobiose								
2,6	2,80	4,7	11°3	11°6	*85*	15,2	8,9	1,4	5,7	1,5	*85*	100	171	83
3,0	3,15	4,0	12°3	12°5	*78*	11,8	8,4	1,0	5,5	0,8	*74*	94	140	83
5,0	4,29	4,5	11°4	11°6	*82*	17,6	8,1	0,7	5,5	2,9	*85*	103	218	76
5,65	5,65	7,8	11°0	11°4	*96*	27,4	11,0	0,6	4,2	0,9	*116*	120	248	50
7,0	8,35	4,3	9°6	9°9	*189*	70,0	14,8	0,7	7,2	1,1	*224*	118	472	42
8,0	9,10	4,0	8°9	9°1	*224*	105	12,1	0,5	6,1	1,2	*279*	124	872	29
						Anaérobiose								
2,6	2,77	79,5	7°9	12°3	*83*	18,8	5,0	1,7	5,7	1,2	*73*	88	376	89
3,0	3,22	61	8°9	12°3	*84*	16,6	6,3	1,0	7,2	1,0	*75*	90	264	98
5,0	4,53	26,5	10°7	12°1	*80*	16,4	6,3	0,8	7,2	1,1	*74*	93	260	100
5,65	5,83	57	8°7	11°9	*112*	31,9	5,6	0,7	6,3	1,3	*101*	86	570	62
7,0	7,61	4,9	10°9	11°1	*169*	53,1	9,3	0,5	4,8	1,0	*159*	94	570	31
8,0	7,77	5,4	10°4	10°7	*209*	80,5	10,1	0,5	4,1	1,0	*216*	103	800	22

est la plus grande. Pour faire la comparaison, il faut bien entendu considérer l'alcool total, obtenu en ajoutant à l'alcool trouvé celui qui correspond au sucre non fermenté, sur la base de 18 g de sucre pour 1° d'alcool. La production d'alcool diminue à mesure que le pH s'élève au-dessus de 3,0.

La production du glycérol suit une marche inverse ; elle est minimum à pH 3,0 — 5,0 et augmente rapidement au-dessus de pH 5,65. Le taux d'acide acétique passe lui aussi par un minimum pour pH 3,0 — 5,0 et augmente beaucoup en milieu alcalin. Ces résultats sont en accord avec les observations de NEUBERG et de PEYNAUD et, plus récemment, de NEISH et BACKWOOD (82). La proportion de la fermentation glycéroacétique augmentant avec le pH (la carboxylase est en effet moins active en milieu alcalin), la quantité de sucre engagé dans la fermentation de GAY-LUSSAC et par suite le rendement en alcool, diminuent.

L'augmentation du pH favorise la production d'acide succinique. Sa teneur double en anaérobiose lorsqu'on passe de pH 2,6 à pH 8,0. Mais l'acide succinique augmente beaucoup moins rapidement que le taux d'acide acétique : le rapport *a/s* passe par un minimum à pH 3,0 et ne cesse d'augmenter jusqu'à pH 8,0.

La teneur en acétoïne diminue quand le pH augmente ; le 2,3-butanediol varie dans le même sens au-dessus de pH 5,0, surtout en anaérobiose. La diminution est beaucoup plus nette lorsqu'on considère le rapport des produits acétoïniques au glycérol : le rendement est alors trois ou quatre fois plus faible à pH 7 ou 8 qu'à pH 3,0. ANDRÉ et DUPUY (4) ont observé la même évolution en comparant des fermentations à pH 3 et 4,95.

L'équation des produits secondaires se vérifie bien à l'abri de l'air et jusqu'à pH 5 en aérobiose. Aux pH élevés, en flacons bouchés d'ouate, les réactions d'oxydation sont favorisées et sont à l'origine de la formation d'une partie de l'acide acétique.

La concentration en ions H^+ est donc un facteur très important agissant sur la formation des produits secondaires. Aux pH élevés, une plus grande proportion de sucre s'engage dans la fermentation glycéroacétique au détriment de la voie normale de GAY-LUSSAC ; de plus les réactions d'oxydation sont favorisées. Ce terme de fermentation glycéroacétique est bien exact : ce sont précisément le glycérol et l'acide acétique qui subissent les augmentations les plus fortes ; l'acide succinique est augmenté de manière plus faible, tandis que les produits butanedioliques ont tendance à diminuer.

Il importe de souligner qu'en anaérobiose la variation de Σ suit celle de g (c'est-à-dire que la somme des produits secondaires calculée d'après l'équation de L. GENEVOIS continue à être équivalente au glycérol), même pour de grandes variations du taux de ce dernier ; ce fait est un argument probant en faveur des équations globales adoptées pour la formation des produits secondaires.

III. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'influence de la température sur la formation des produits secondaires a été étudiée par plusieurs expérimentateurs qui ont donné des résultats assez contradictoires. Laborde (64) a trouvé que le glycérol augmente généralement avec la température, les différentes races de levures se conduisant de façon variée. Mais Straub, Kulisch et Kauschke ont affirmé au contraire que le glycérol diminue quand la température augmente et Mach et Portelé trouvent plus de glycérol et d'acide succinique à 12° ou 15°C qu'à 25°C (134). L. Genevois (32) a souligné qu'il se forme plus d'acide acétique à 7°C qu'à 20°C. Castelli (16) a remarqué que la température optimum pour la production d'alcool dépend de la race de la levure et que les quantités d'acide acétique formées sont en général plutôt faibles aux basses températures.

Récemment Rankine (116) a observé pour plusieurs souches de levures que la production de glycérol était toujours plus élevée à 25°C qu'à 15°C, tandis que pour la formation d'acide acétique, le comportement des levures est très variable suivant la température ; les quantités les plus fortes peuvent être obtenues aussi bien à 25°C qu'à 15°C ou qu'à 35°C.

Reprenant cette étude, nous avons fait fermenter toujours dans les deux mêmes conditions d'aération, un moût de raisin de 13° Baumé par le *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Nous avons déterminé les produits secondaires formés à cinq températures différentes, de 15°C à 35°C.

Le tableau X rapporte les résultats de la fermentation conduite à l'abri de l'air. On voit que c'est à 15°C que la fermentation a transformé le plus de sucre.

Le glycérol augmente, en règle générale, quand la température croît. La proportion de sucre subissant la fermentation glycéropyruvique est maximum à 35°C ; elle est minimum à 15°C. D'après Brockmann et Stier (14), à des températures avoisinant 40°C, la levure formerait moins de glycérol, mais la quantité de sucre fermenté est alors très faible.

L'acide succinique diminue légèrement quand la température augmente, tandis que les variations de l'acide acétique ne sont pas régulières. Finalement le rapport *a/s* augmente légèrement de 15°C à 35°C, la levure gardant toujours son caractère acétogène. L. Genevois a remarqué sur des levures autrichiennes (34) que le froid ne modifie pas les produits formés par les levures acétogènes ; au contraire les levures succinogènes accumulent à faible température l'acide acétique et deviennent acétogènes.

La production d'acétoïne augmente avec la température ; il en est de même pour le 2,3 butanediol.

Nous trouvons des valeurs de Σ voisines de celles de g. Le rapport Σ/g diminue avec l'élévation de la température et il semble qu'à des températures plus basses, peut-être simplement parce que la durée de la fermentation est prolongée, interviennent plus facilement des enzymes respiratoires.

L'influence de la température sur la formation des produits secondaires est donc loin d'être négligeable. Certaines des réactions d'utilisation de l'éthanal sont très sensibles à l'action de la température.

TABLEAU X

Influence de la température sur la formation des produits secondaires Moût de 13°B fermenté en anaérobiose par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en g.

Température	Sucre restant	Alcool formé	Glycérol g	Acide acétique a	Acide succinique s	Acétoïne m	2,3 — butanediol b	Éthanal h	Σ	100 Σ/g	100 a/s	1000 $(b+m)/g$
15°	1	12°6	*62*	11,8	6,5	1,1	5,3	0,6	*64*	104	182	103
20°	30	11°5	*69*	15,3	6,1	1,1	5,7	0,7	*70*	101	250	98
25°	23	11°9	*68*	15,5	5,4	1,5	6,4	1,1	*68*	101	287	116
30°	46	10°5	*73*	14,1	5,2	1,3	6,4	1,2	*64*	88	276	105
35°	82	7°8	*78*	14,3	5,3	2,2	7,4	1,2	*68*	87	276	123

Il faut remarquer aussi qu'une élévation de température augmente le taux de la fermentation glycéropyruvique ; on peut penser qu'elle favorise l'oxydoréduction portant sur la phosphoglycéraldéhyde ou retarde la réduction de l'éthanal.

IV. — INFLUENCE DE LA NATURE DU MILIEU

Le taux des produits secondaires formés par une même levure varie beaucoup suivant la nature du milieu fermenté. PASTEUR (96) avait déjà remarqué que les quantités de glycérol et d'acide succinique n'étaient pas les mêmes dans les vins et dans les fermentations en milieu sucré synthétique. LABORDE étudiant l'influence du milieu sur la production de glycérol constate que celle-ci est d'autant plus importante que la fermentation est plus pénible. VENTRE (141) signale que la teneur en glycérol et en acides volatils dépend du milieu fermentescible.

Nous avons étudié la formation des produits secondaires dans différents milieux naturels : moûts de raisin, moûts de bière, jus de cerises,

de pêches, de tomates et d'oranges. On opérait parallèlement avec un milieu synthétique préparé de la façon suivante. On calcine au four à moufle de la levure de boulangerie préalablement desséchée ; les cendres obtenues sont dissoutes dans de l'eau bidistillée (nous utilisons 500 g de levure fraîche pour 3 litres de milieu). Le milieu minéral obtenu est additionné de sucre, de 100 mg d'azote sous forme de sulfate d'ammonium, de 100 mg d'azote sous forme d'asparagine et des sept facteurs de croissance aux doses suivantes par litre : thiamine (0,2 mg), pantothénate de calcium (0,2 mg), acide paraaminobenzoïque (0,2 mg), acide nicotinique (0,2 mg), pyridoxine (0,2 mg), mésoinositol (10 mg), biotine (0,020 mg).

L'expérience a été faite avec une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans les deux conditions d'aération habituelles, et à la température de 25°C. Avant l'ensemencement tous les milieux étaient ajustés à pH 3,5 et à 200 g de sucre par litre.

Les résultats obtenus exposés dans le tableau XI pour la série fermentant en anaérobiose montrent que la nature du milieu fermenté influe non seulement sur le taux des produits secondaires, mais aussi sur la production d'alcool.

La fermentation va moins loin dans certains milieux comme le moût de bière ou la solution synthétique que dans les jus de fruits.

Tous les produits secondaires varient d'un milieu à l'autre. Le glycérol, le 2,3-butanediol, l'acide succinique varient sensiblement de 1 à 2,5, l'acétoïne de 1 à 5, l'acide acétique de 1 à 1,5. Cependant certains rapports demeurent constants : il est assez remarquable que mis à part le moût de bière et le milieu synthétique, les rapports 100 a/s obtenus dans les divers jus de fruits fermentés présentent des valeurs assez semblables. Il en est de même du rapport des produits butanedioliques au glycérol pour un certain nombre de milieux de culture.

On constate que la formation de glycérol est minimum pour le moût de bière, maximum pour le jus de cerises bigarreau. Les produits butanedioliques sont très faibles pour le jus de pêches et pour le moût de bière, très élevés au contraire dans le jus de cerises et le milieu synthétique. Enfin c'est dans les jus de cerises fermentés qu'on rencontre le plus d'acide succinique, tandis que les jus de pêches donnent le moins d'acide acétique.

Le bilan des produits secondaires n'est correct dans les deux conditions d'aération que dans le cas des moûts de raisins et des jus de tomates et d'oranges. Dans le cas des jus de cerises et de pêches, ce bilan est exact à l'abri de l'air mais non en milieu aéré. Ce fait et la grande quantité d'éthanal formée permettent de penser que l'excès de Σ sur g en milieu aéré est dû à une formation d'éthanal par oxydation et peut-être aussi d'acétoïne et d'acide succinique dans les jus de cerises.

Dans le cas du moût de bière Σ dépasse largement g même en anaé-

Tableau XI

Influence de la nature du milieu sur la formation des produits secondaires

Milieux amenés à 200 g de sucre par l et ajustés à pH 3,5.

Saccharomyces ellipsoïdeus nº 41.

Teneurs en mmol par litre. Le sucre est exprimé en *g*. Fermentations conduites en anaérobiose.

Milieu	Sucre restant	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
Moût de raisin ..	13,1	11°3	*67*	10,4	6,4	0,5	6,9	0,8	*61*	92	168	110
Moût de bière ...	74,2	6°3	*37*	13,7	3,6	0,8	3,1	0,9	*51*	138	380	105
Jus de cerises bigarreau	4,3	10°1	*82*	12,8	8,0	0,4	7,8	0,4	*75*	91	160	100
Jus de cerises guin	3,6	9°6	*63*	10,7	8,8	0,4	7,5	1,6	*75*	119	122	125
Jus de pêches blanches.	2,0	10°1	*53*	9,4	6,2	0,3	3,5	1,5	*55*	104	151	72
Jus de pêches jaunes	2,3	9°2	*51*	8,0	5,6	0,2	3,1	2,4	*50*	98	142	65
Jus de tomates ..	2,4	10°2	*73*	10,6	7,7	0,2	5,9	2,1	*68*	93	138	84
Jus d'oranges....	2,6	11°4	*62*	9,6	6,5	0,2	6,0	2,0	*60*	97	147	100
Milieu synthétique	39,5	9°8	*56*	11,6	5,6	1,1	8,0	1,3	*63*	113	207	162

robiose ; il y a certainement dans ce cas intervention de diastases contenues dans le milieu ou d'activeurs qui favoriseraient des réactions supplémentaires. Il en est de même à un moindre degré dans un jus de cerises et dans le milieu synthétique. Il faut remarquer en tous cas le taux très faible du glycérol dans le moût de bière, aussi bien en anaérobiose qu'en présence d'air. Il n'en est pas moins intéressant de souligner qu'alors que g varie de 1 à 2,5, le rapport Σ / g reste toujours de l'ordre de 1.

La nature du milieu a donc une influence profonde sur les quantités relatives des produits secondaires que l'on trouve à la fin de la fermentation. Par les coenzymes, les facteurs de croissance et les activeurs spéciaux qu'apportent les divers milieux naturels, ils peuvent provoquer pour une levure donnée des modifications importantes dans le taux des produits de la fermentation et transformer les bilans.

V. — INFLUENCE DES FACTEURS DE CROISSANCE

Nous avons étudié de façon plus précise l'influence de la composition du milieu en facteurs de croissance sur la formation des produits secondaires. La plupart de ces facteurs agissent en effet comme cofermments des diastases impliquées dans les processus de la fermentation. C'est le cas par exemple de la thiamine qui est le coenzyme de la carboxylase, de l'acide nicotinique qui entre dans la composition de la codéhydrase, etc. D'autre part on sait que pour certaines levures, en l'absence de certaines vitamines, la multiplication et la fermentation ne sont plus possibles ; pour d'autres cette absence se traduit par une modification de l'allure de la fermentation et de la croissance. Ces phénomènes ont été étudiés récemment par S. Lafourcade et E. Peynaud pour les levures de vin (68). Ainsi dans le cas de *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41 que nous utilisons dans notre travail, ces auteurs ont trouvé notamment que l'absence de biotine restreignait beaucoup la croissance et que l'absence d'acide pantothénique se traduisait par un retard de la fermentation, la phase initiale de latence étant beaucoup plus longue ; dans ces dernières conditions, la levure arrivait à fermenter la même quantité de sucre, mais dans un intervalle de temps beaucoup plus grand.

Nous avons étudié les produits de la fermentation par le même *Saccharomyces ellipsoïdeus*, d'un milieu synthétique contenant par litre :

Cendres de 170 g environ de levure fraîche.
Saccharose : 182 g.
Sulfate d'ammonium : 1 g.
Asparagine : 2 g.
Phosphate monopotassique : 1 g.
Acide citrique : 6 g.
Soude, quantité suffisante pour amener le pH à 3,45.

Les vitamines étaient employées aux doses suivantes :

Thiamine : 0,2 mg.
Pantothénate de calcium : 0,2 mg.
Acide nicotinique : 0,2 mg.
Pyridoxine : 0,2 mg.
Acide paraaminobenzoïque : 0,2 mg.
Mésoinositol : 10 mg.
Biotine : 20 γ.

Nous avons expérimenté à 25°C, dans les deux conditions d'aération habituelles et avec un ensemencement faible. L'expérience comportait dans chaque cas 9 flacons : l'un fermentant sans aucune vitamine, un autre avec toutes les vitamines ; les 7 autres contenaient tous les facteurs de croissance sauf un, différent dans chaque cas. Nous avons pu étudier ainsi l'effet de l'absence de chacun de ces facteurs sur la formation des produits secondaires. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XII.

La fermentation est retardée dans les flacons sans vitamine et sans pantothénate. L'absence de ce dernier influence nettement le taux des produits secondaires ; les quantités de glycérol, d'acide acétique et de 2,3-butanediol sont augmentées, aussi bien à l'abri de l'air qu'à l'air. La proportion de la fermentation glycéropyruvique représentée par le rapport $\frac{\text{glycérol}}{\text{sucre fermenté}}$, est beaucoup plus élevée (20 à 25 p. 100) quand l'acide pantothénique manque dans la solution nutritive. L'augmentation de la concentration de l'acide acétique en l'absence d'acide pantothénique se retrouve dans les deux séries, mais elle est surtout nette dans la fermentation à l'abri de l'air. Lipmann et collaborateurs ont montré que l'acide pantothénique entre dans la constitution d'un coenzyme, essentiel pour les acétylations biologiques, qu'ils ont appelé coenzyme A. Novelli et Lipmann (92) ont montré que l'acétate est oxydé par la levure beaucoup plus rapidement en présence d'acide pantothénique. Il résulte de leurs travaux que cet acide est essentiel pour toute une série de réactions (et peut-être toutes les réactions) impliquant le groupement acétyle (Sebrell et Harris (128)). Notre expérience montre l'accumulation d'acide acétique et également celle, assez importante, du glycérol en l'absence d'acide pantothénique au cours de la fermentation surtout en anaérobiose. C'est un fait nouveau et on peut penser que la carence en ce facteur provoquant un retard de la fermentation de Gay-Lussac, la période d'induction est plus longue et les mécanismes secondaires sont favorisés.

L'absence de mésoinositol ou de biotine diminue au contraire la formation de glycérol et d'acide succinique, mais n'a pas d'action nette sur les autres produits secondaires. Remarquons que là encore, il n'y a pas parallélisme entre la variation de l'acide succinique et celle des autres sous-produits.

Les autres facteurs de croissance ne semblent pas avoir un effet très

Tableau XII

Influence des facteurs de croissance sur la formation des produits secondaires

Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41.

A part le sucre et l'alcool, les concentrations sont exprimées en mmol par litre.

	Sucre	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	Acétoïne *m*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1 000 (*b* + *m*)/*g*
Aérobiose												
Sans vitamine	16,7	9°0	*59*	17,5	3,6	0,4	6,4	1,1	*61*	105	485	115
Avec 7 vitamines	3,4	9°6	*79*	17,5	4,0	0,3	5,4	3,1	*64*	81	438	72
Sans pyridoxine	traces	9°8	*79*	11,5	4,6	0,2	4,3	1,7	*52*	66	250	57
Sans biotine	0,6	9°8	*65*	13,1	3,9	0,2	6,2	1,1	*53*	82	336	98
Sans mésoinositol	traces	9°7	*66*	7,5	3,7	0,1	3,4	3,7	*41*	62	202	53
Sans acide nicotinique	traces	10°0	*86*	10,6	5,1	0,1	4,3	1,4	*53*	62	210	52
Sans pantothénate de Ca	traces	9°8	*88*	20,9	4,3	0,1	7,2	1,1	*72*	81	485	83
Sans acide paraaminobenzoïque	traces	9°7	*78*	13,2	4,9	0,1	5,1	1,8	*58*	74	270	67
Sans thiamine	0,4	9°8	*83*	12,5	4,8	0,1	3,3	1,0	*54*	65	260	41
Anaérobiose												
Sans vitamine	23,2	9°0	*67*	22,5	4,2	0,4	7,3	2,7	*77*	115	535	115
Avec 7 vitamines	1,2	10°0	*80*	8,1	6,3	2,9	7,3	2,1	*63*	79	128	127
Sans pyridoxine	0,3	10°3	*59*	8,1	4,5	0,2	6,5	0,9	*47*	80	180	114
Sans biotine	0,3	10°2	*61*	9,0	4,2	0,6	7,6	1,1	*49*	80	215	134
Sans mésoinositol	0,2	10°3	*69*	8,7	4,1	1,0	7,7	1,8	*49*	72	212	126
Sans acide nicotinique	0,2	10°0	*74*	6,9	5,7	2,0	8,4	2,8	*57*	77	121	140
Sans pantothénate de Ca	0,1	9°8	*101*	23,1	5,7	0,6	11,0	5,4	*92*	91	412	114
Sans acide paraaminobenzoïque	0,2	10°2	*72*	7,6	5,7	1,5	6,8	1,7	*55*	76	133	115
Sans thiamine	traces	10°2	*71*	6,5	6,3	0,2	2,9	2,8	*51*	72	103	48

net sur les taux des produits secondaires, sauf la thiamine dont l'absence se traduit par une diminution marquée des corps acétoïniques. Or, l'ester pyrophosphorique de la thiamine constitue la cocarboxylase. Cette observation semble donc appuyer l'hypothèse qui attribue à un complexe carboxylasique la responsabilité de la condensation acétoïnique, à l'exclusion d'une « carboligase » distincte comme l'entendait NEUBERG ; nous aurons l'occasion d'y revenir dans le chapitre VII.

La carboxylase étant également nécessaire à la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal, il est possible qu'en l'absence de thiamine une certaine quantité d'acide pyruvique n'ait pas été décarboxylée et se soit accumulée dans le milieu ; ceci expliquerait la faiblesse de Σ par rapport à g. Nous avons recherché cet acide par la 2,4 dinitrophénylhydrazine dans les témoins et dans les fermentations carencées en thiamine ; le résultat a été négatif dans le premier cas, mais dans les milieux fermentés sans thiamine, nous avons précipité, caractérisé et pesé la 2,4 dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique et nous avons ainsi constaté la présence de 2 mmol par litre d'acide pyruvique en aérobiose et de 3,6 mmol par litre de cet acide en anaérobiose.

Plusieurs facteurs de croissance agissent donc sur les mécanismes mêmes de la formation des produits secondaires, sans doute parce qu'ils entrent dans la composition des enzymes responsables de ces réactions.

On remarque de plus qu'en l'absence de mésoinositol, d'acide nicotinique ou de thiamine, les produits dosés ne correspondent pas au glycérol ; ils sont à un taux inférieur (Σ/g faible), et on peut envisager la production d'autres substances, peut-être simplement l'accumulation d'acide pyruvique.

VI. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN SUCRE

On conçoit qu'il y ait une relation entre la quantité de sucre fermenté et les proportions des produits secondaires formés. LABORDE, dès 1899, a signalé que le rendement en glycérol augmentait avec la richesse en sucre du milieu à fermenter, et d'autres auteurs ont fait des observations semblables en particulier en ce qui concerne l'acidité volatile.

Nous avons étudié les variations des différents produits secondaires avec la concentration en sucre dans le cas de fermentations par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Notre expérience portait sur deux milieux : un moût de raisin ayant naturellement 200 g de sucre par litre, additionné de saccharose de façon à réaliser des teneurs de 300 et 400 g, un milieu synthétique préparé de la même façon que dans le paragraphe précédent, et recevant différentes quantités de saccharose : 56, 110, 220, 350 et 450 g par litre.

Le dosage des produits secondaires en fin de fermentation a permis de dresser les tableaux XIII et XIV.

Tableau XIII

Influence de la teneur en sucre sur la formation des produits secondaires

Moût de raisin fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41

Les sucres sont exprimés en g par litre ; les produits secondaires en mmol par litre.

Teneur en sucre	Sucre fermenté	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 — butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
					Aérobiose					
200	199	*84*	10,6	10,5	5,2	2,1	*81*	96	101	62
300	250	*92*	20,6	11,0	10,7	1,1	*108*	117	188	116
400	210	*124*	36,7	8,7	7,8	1,5	*126*	102	423	63
					Anaérobiose					
200	186	*67*	14,2	8,0	6,4	0,9	*75*	112	177	96
300	181	*90*	23,0	7,1	10,5	0,8	*93*	103	325	117
400	146	*120*	33,0	7,3	6,8	1,5	*111*	92	450	57

TABLEAU XIV

Influence de la teneur en sucre sur la formation des produits secondaires.

MILIEU SYNTHÉTIQUE fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* nº 41.

Les sucres sont exprimés en g par litre ; les produits secondaires en mmol par litre.

Teneur en sucre	Sucre fermenté	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3 — butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
				Aérobiose						
56	56	*43*	3,6	4,6	0,8	0,2	*31*	73	78	19
110	110	*69*	9,3	5,0	2,5	1,3	*47*	68	186	36
220	220	*88*	12,4	5,0	9,8	1,1	*61*	68	248	111
350	288	*103*	24,8	5,0	20,3	1,5	*96*	93	496	196
450	194	*145*	36,2	5,5	23,6	5,1	*129*	88	658	167
				Anaérobiose						
56	56	*41*	4,2	4,6	0,9	0,3	*33*	78	91	22
110	110	*65*	8,1	4,8	2,7	1,0	*44*	67	168	41
220	193	*66*	12,4	5,7	9,8	1,4	*64*	98	218	148
350	170	*90*	20,6	4,6	13,8	2,8	*81*	89	450	153
450	170	*120*	33,6	5,5	17,8	4,2	*117*	97	610	148

On constate que le rendement absolu en glycérol augmente avec la teneur en sucre, comme l'avait remarqué LABORDE. Mais si l'on calcule la proportion de la fermentation glycéropyruvique, on observe qu'elle est généralement la plus faible pour une teneur en sucre de 200 g par litre. Elle s'élève lorsque cette teneur s'accroît ; elle est plus forte aussi dans le cas de milieux peu sucrés ; ceci est logique, puisque la plus grande partie du glycérol se forme aux dépens des premiers 50 g de sucre pendant la phase d'induction de la fermentation.

Le taux d'acide acétique augmente beaucoup avec la teneur en sucre, ainsi que le 2,3-butanediol dans la majorité des cas. Or la quantité de sucre fermenté dans tous ces milieux est souvent du même ordre de grandeur. L'augmentation des produits secondaires n'est donc pas due simplement au fait qu'il y avait davantage de sucre à fermenter, davantage de « matière première » à transformer. On doit penser qu'une forte concentration initiale en sucre favorise la fermentation glycéroacétique et les autres mécanismes de formation des produits secondaires. Seul le taux d'acide succinique ne présente aucune variation nette; il est presque aussi important lorsqu'il n'y a que 56 g de sucre à fermenter que lorsqu'il y en a 450 g dans le milieu. En conséquence, le rapport a/s ne cesse d'augmenter avec la richesse initiale en sucre.

On remarque aussi que non seulement le 2,3-butanediol augmente lorsque la teneur en sucre croît, mais que généralement le rapport 1000 b/g augmente de même. L'accroissement de la condensation acétoïnique est donc plus rapide que l'augmentation du taux de fermentation glycéropyruvique.

Autre remarque, le taux d'éthanal restant est beaucoup plus élevé pour les fortes teneurs en sucre (voir aussi chapitre IV).

La relation du bilan de fermentation se vérifie dans presque tous les cas, même pour les très fortes teneurs en glycérol. Comme nous l'avons souligné au sujet des fermentations alcalines, c'est là un argument non négligeable en faveur de l'hypothèse de l'équivalence du glycérol et des autres produits secondaires affectés des coefficients proposés par L. GENEVOIS.

VII. — ACTION D'UN ACTIVEUR DE FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

NIELSEN et HARTELIUS ont montré, en 1937 (91), qu'*Aspergillus niger* synthétise des substances capables d'accélérer la multiplication de *Saccharomyces cerevisiae*. Lorsqu'on ajoute à un milieu à fermenter du mycélium d'*Aspergillus niger* lavé à l'alcool, desséché et finement broyé, cette poudre active fortement la fermentation alcoolique. J. RIBÉREAU-

Gayon, E. Peynaud et S. Lafourcade ont montré que la plupart des moisissures et en particulier le *Botrytis cinerea* possèdent le même activeur (123). Une application pratique de ces produits au cours de la vinification a été envisagée. Ces auteurs ont observé qu'en présence d'un demi-gramme par litre de cette poudre de mycélium, la quantité de sucre fermenté en quatre jours est augmentée de 50 p. 100 et la population des levures est doublée. Kiessling (56) a montré que ce produit, qui contient en outre des facteurs de croissance pour les levures du groupe du bios, agit en doublant le taux des triosephosphates dosables en cours de fermentation. On doit donc s'attendre à une formation plus grande de glycérol et des autres produits secondaires.

Nous avons voulu voir dans quelle mesure l'introduction de cet activeur dans un milieu qui fermente, modifie la formation des produits secondaires (122).

Nous avons fait porter notre expérience sur deux milieux, un moût de raisin à 180 g de sucre par litre de pH 3,2 et un milieu à l'eau de levure à 200 g de saccharose par litre et de pH 5,6, fermentés par une levure *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Un flacon de chaque milieu recevait au départ 1 g par litre de poudre d'*Aspergillus*. Les fermentations avaient lieu à 25°C à l'abri de l'air.

Tableau XV

Action des activeurs d'origine fongique sur la formation des produits secondaires. Saccharomyces ellipsoïdeus n° 51

Teneurs en sucre en g par litre ; les autres chiffres sont des mmol par litre.

	Sucre restant	Alcool	Glycérol *g*	Acide acétique *a*	Acide succinique *s*	2,3-butanediol *b*	Éthanal *h*	Σ	100 Σ/*g*	100 *a*/*s*	1000 *b*/*g*
Moût de raisin 10° B											
Témoin	12,2	9°8	*52*	10,1	5,2	3,7	1,0	*51*	98	194	70
Activeur d'*Aspergillus*	4,0	10°2	*73*	6,9	6,6	3,2	0,7	*51*	70	104	44
Milieu à l'eau de levure											
Témoin	5,5	11°9	*61*	10,0	6,1	4,4	0,7	*56*	92	164	72
Activeur d'*Aspergillus*	1,0	12°0	*76*	6,6	7,0	3,9	0,6	*53*	69	94	51
Moût de raisin 12°5 B											
Témoin	20	12°7	*82*	10,2	5,1	8,5	1,4	*74*	90	377	104
Activeur de *Botrytis*	3,2	13°0	*90*	10,3	7,6	9,7	0,8	*69*	77	136	108

Nous avons fait la même expérience en comparant à un témoin la fermentation d'un moût de 12°5 Baumé, additionné de mycélium de *Botrytis cinerea*. Ce mycélium avait été lavé à l'alcool, desséché et réduit en poudre. Il a la propriété d'activer la fermentation et d'augmenter la population des levures.

Le tableau XV rassemble les résultats obtenus dans ces deux expériences.

Les deux produits ont manifesté les mêmes propriétés ; ils ont permis à la fermentation qui se déroule à l'abri de l'air de transformer davantage de sucre. D'autre part, on peut calculer que la proportion de sucre subissant la fermentation glycéropyruvique est augmentée de 5,5 à 7 p. 100 ; le rendement en alcool est en conséquence légèrement abaissé de quelques dixièmes de degré.

Les autres produits secondaires subissent aussi des variations. L'acide acétique est fortement diminué, tandis que l'acide succinique augmente.

Fait important : le bilan de fermentation est déficitaire en présence d'activeur. Tout se passe comme si l'activeur favorisait, à partir de l'acide pyruvique de la fermentation glycéropyruvique, la formation de produits indosés. Les bilans acidimétriques ont montré que ces produits n'étaient vraisemblablement pas des acides.

VIII. — CONCLUSIONS

Tous les facteurs essayés dans ce chapitre influent finalement plus ou moins sur la proportion des différents produits secondaires. De petites différences d'aération, de température, d'acidité réelle, de richesse en sucre, interviennent dans les processus de la fermentation et modifient les quantités de glycérol, d'acide acétique, d'acide succinique, de 2,3-butanediol qu'on trouve dans les milieux fermentés. Signalons que nous avons étudié l'influence des conditions d'aération, de température et de concentration en ions hydrogène également sur la fermentation par une *Kloeckera apiculata* ; les résultats obtenus sont en gros de même sens qu'avec le *Saccharomyces ellipsoïdeus* mais en milieu aéré la fermentation est accompagnée de phénomènes oxydatifs.

La nature même du milieu dans lequel se développent les levures et, vraisemblablement, son taux en facteurs de croissance et en facteurs d'activation, dont certains nous sont du reste inconnus, sont capables de modifier profondément l'importance de la fermentation glycéropyruvique et le mode de distribution des divers produits secondaires à partir de l'éthanal. Les facteurs de croissance qui agissent comme coferments dans les processus fermentatifs, jouent ici un rôle déterminant et modifient dans un sens ou dans un autre la genèse de ces produits. Nous tou-

chons là au mécanisme de la formation de ces corps secondaires. L'expérience montre que pratiquement toutes les vitamines agissant par ailleurs sur la croissance des levures, sont impliquées dans ces réactions. Certaines favorisent le mécanisme glycéropyruvique, ce sont la biotine, la pyridoxine et le mésoinositol, d'autres au contraire, intervenant vraisemblablement dans le processus de la fermentation de GAY-LUSSAC, diminuent la durée de la phase d'induction, c'est notamment l'acide pantothénique.

D'autre part, le rôle joué par l'acide pantothénique dans la formation de l'acide acétique, et celui de la vitamine B_1 qui influe sur la condensation butanediolique, sont des faits susceptibles d'aider à l'interprétation du mécanisme de ces réactions.

Chapitre IV

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

L'éthanal formé dans le processus de la fermentation selon le schéma de Gay-Lussac ne peut s'accumuler dans le milieu, car il est réduit au fur et à mesure de sa formation. Au contraire, l'éthanal issu de la fermentation glycéropyruvique s'accumule plus ou moins suivant la vitesse avec laquelle il est utilisé par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires.

La teneur en éthanal au cours de la fermentation est en rapport avec deux facteurs : le taux de la fermentation glycéropyruvique et la vitesse avec laquelle il est utilisé. Cette teneur doit donc éclairer les mécanismes dans lesquels est impliqué l'éthanal et nous lui avons consacré une étude systématique. Quelques résultats ont déjà été publiés (121).

Nous avons d'abord suivi l'évolution de l'éthanal au cours des fermentations provoquées par deux levures *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Une souche avait été isolée d'un moût de Sauternes et l'autre de Saint-Émilion. Ces essais ont été faits avec deux milieux : un moût de raisin ayant 153 g de sucre par litre et un muté désulfité par barbotage de vapeur d'eau ayant 250 g de sucre et 58 mg d'acide sulfureux total. La fermentation du sucre a été suivie par l'analyse, la multiplication des levures par numération cellulaire, et nous dosions l'éthanal par la méthode Jaulmes-Espezel après distillation à pH 9.

Nous avons conduit nos expériences dans les deux conditions d'aération habituelles : flacons obturés d'un tampon d'ouate et flacons bouchés d'un dispositif à tube effilé (réalisant un état d'anaérobiose suffisant lorsque la fermentation est assez rapide, ce qui est toujours le cas des levures elliptiques). Les résultats obtenus permettent de construire les courbes d'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté (fig. 1 et 2).

Nous constatons en premier lieu qu'il se forme davantage d'éthanal pour la même quantité de sucre fermenté, dans le milieu qui contenait de l'anhydride sulfureux. Ceci s'explique par le blocage sous forme de combinaison sulfitique d'une certaine quantité d'éthanal qui échappe ainsi aux enzymes de condensation et de dismutation ; en effet dans les conditions de notre dosage, cet éthanal combiné à l'anhydride sulfureux est titré en même temps que l'éthanal libre.

L'allure des courbes est partout la même : montée rapide au début de la fermentation, au moment où le taux de la fermentation glycéropyruvique est important pendant la phase d'induction. La vitesse de formation de l'éthanal est alors supérieure à la vitesse d'utilisation. Puis la courbe redescend après passage par un maximum pour 50 à 100 g de sucre fermenté. A ce moment on se trouve dans la phase normale de la fermentation ; le taux de la fermentation glycéropyruvique est beaucoup moins élevé et la vitesse d'utilisation de l'éthanal devient plus grande que celle de sa formation. La vitesse d'utilisation de l'éthanal semble être constante tout au long de la fermentation ; la fraction du sucre qui subit la fermentation glycéropyruvique diminue constamment.

La teneur maximum en éthanal est, dans tous les cas, plus élevée dans les fermentations conduites en anaérobiose. Ceci s'expliquerait par une utilisation ralentie de l'éthanal dans ces conditions, les enzymes provoquant la formation des produits secondaires étant sensibles à l'action de l'aération, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

Dans le cas des fermentations à l'air on observe, à la fin de la fermentation, une remontée de la courbe qui correspond à une formation d'éthanal par oxydation de l'alcool.

Les produits secondaires se formant à partir de l'éthanal issu de la fermentation glycéropyruvique, il est probable que les proportions de ces différents produits sont en rapport avec la quantité d'éthanal libre.

L'analyse des milieux fermentés dans cette expérience nous a donné des résultats que nous ne reproduirons pas ici, et qui sont tout à fait en accord avec ceux exposés au chapitre précédent.

Nous avons vu que la somme des produits secondaires (Σ) est toujours plus faible en anaérobiose qu'en milieu aéré, et nous constatons ici que la teneur maximum en éthanal libre est au contraire plus élevée à l'abri de l'air. La forte accumulation d'éthanal en anaérobiose n'a donc pas pour résultat une formation plus grande de produits secondaires.

On sait qu'il y a formation plus importante d'acide acétique et de 2,3-butanediol en anaérobiose. L'acide succinique au contraire est plus abondant en milieu aéré ; la teneur en enzyme de condensation succinique étant faible, en anaérobiose, il se fait peu d'acide succinique. Tout se passe comme si l'éthanal non utilisé était alors dismuté en acide acétique ou formait du 2,3-butanediol.

Si l'on admet que l'acide succinique se forme à partir de l'acide acétique, une autre interprétation est possible : en anaérobiose, il y a moins d'aldéhydomutase et moins d'enzyme de condensation ; il reste donc davantage d'éthanal libre et il se forme moins d'acide succinique ; l'activité « carboligasique » portant sur davantage d'éthanal, il se fait plus de 2,3-butanediol. Nous discuterons dans le chapitre VI les hypothèses sur la formation de l'acide succinique.

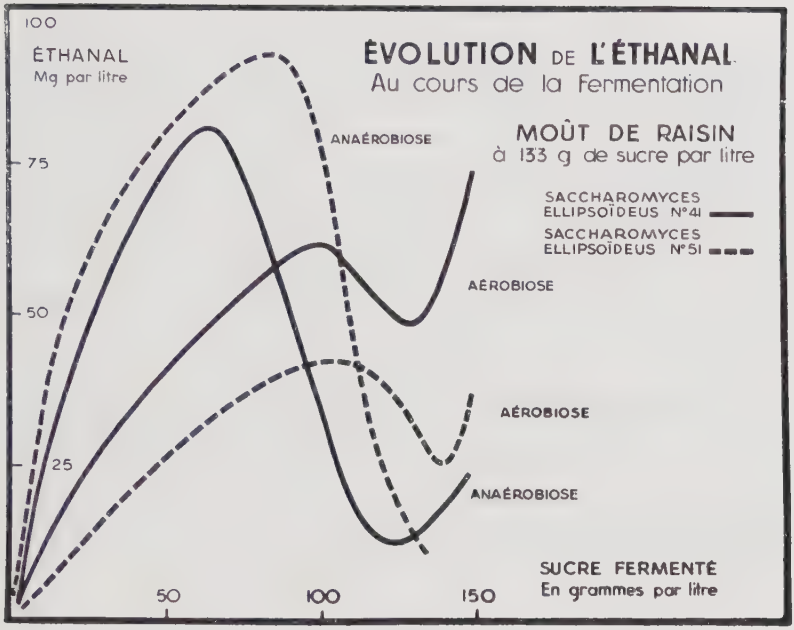

100
ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL
Au cours de la Fermentation
MOÛT DE RAISIN
à 133 g de sucre par litre
ANAÉROBIOSE
SACCHAROMYCES ELLIPSOÏDEUS N°41
SACCHAROMYCES ELLIPSOÏDEUS N°51
AÉROBIOSE
AÉROBIOSE
ANAÉROBIOSE
75
50
25
50
100
150
SUCRE FERMENTÉ
En grammes par litre

FIG. 1.

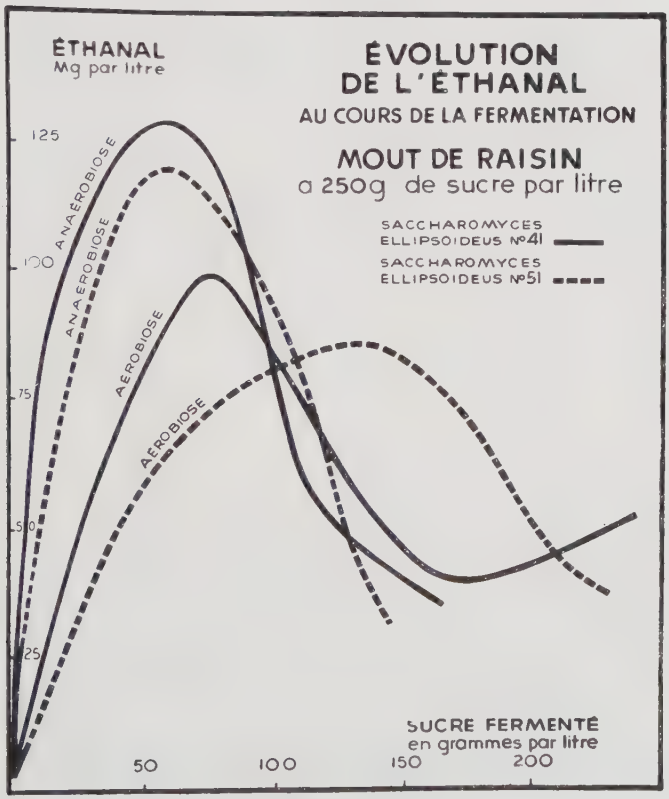

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION
DE L'ÉTHANAL
AU COURS DE LA FERMENTATION
MOUT DE RAISIN
a 250g de sucre par litre
SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS N°41
SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS N°51
125
100
75
50
25
ANAÉROBIOSE
ANAÉROBIOSE
AÉROBIOSE
AÉROBIOSE
50
100
150
200
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 2

Les produits secondaires paraissent donc se former à partir de l'éthanal libre. On sait que si l'on augmente ce taux, par exemple par addition directe, on trouve davantage de tous les produits secondaires ; si, au contraire, on fixe l'éthanal au fur et à mesure de sa formation à l'état de combinaison stable, il se forme peu de ces corps. Nous en citerons des exemples au chapitre V. Mais d'autres facteurs peuvent agir sur l'équilibre qui commande la teneur en éthanal et nous sommes ainsi amenés à étudier l'influence sur l'évolution de l'éthanal des facteurs qui, dans le chapitre précédent, se sont montrés capables de modifier la formation des produits secondaires.

I. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN AZOTE AMMONIACAL

Nous avons fait fermenter à 25°C deux séries de flacons d'un moût ayant 145 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans les deux conditions d'aération précédentes. Ce moût titrait 68 mg d'azote ammoniacal. Une série a reçu 100 mg par litre d'azote sous forme de

Tableau XVI

Influence de l'azote ammoniacal sur l'évolution de l'éthanal.

Moût à 145 g de sucre par l fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Le sucre est exprimé en g, l'éthanal en mg par litre.

Temps	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin		+ NH_4 (1)		Témoin		+ NH_4 (1)	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
36 h	6	31	4	31	—	21	—	20
60 h	70	70	70	77	30	87	33	88
4 j	123	31	135	34	70	97	81	94
5 j	141	40	141	47	107	63	114	58
6 j	—	58	—	36	128	36	133	40
7 j	—	88	—	41	—	29	—	31
9 j	—	—	—	—	140	28	140	28

(1) 100 mg de N sous forme de sel ammoniacal.

sulfate d'ammonium et l'autre a servi de témoin. Nous avons suivi l'évolution de l'éthanal, le sucre fermenté et la population des levures, et nous avons dosé les produits secondaires à la fin de la fermentation.

Les résultats rassemblés dans le tableau XVI montrent que l'addition d'azote ammoniacal ne modifie en rien l'évolution de l'éthanal, ni le maximum atteint. Si l'on trace les courbes de cette évolution, elles se confondent. D'autre part, la teneur en cation ammonium n'a pratiquement pas d'effet sur la formation des divers produits secondaires. L'accé-

lération de la vitesse de fermentation elle-même a été faible : au plus une dizaine de g de sucre d'écart. La population des levures est un peu plus forte dans le moût enrichi, surtout au début de la fermentation. Le troisième jour, elle est de 57 000 cellules par mm³ au lieu de 50 000 à l'air et de 17 000 au lieu de 14 000 à l'abri de l'air. Pour la population finale, l'effet est moins net : 72 000 au lieu de 70 000 et 41 000 au lieu de 34 000.

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE

Nous avons étudié de la même façon et avec la même levure l'influence de la concentration en ions H^+ sur la teneur en éthanal libre au cours de la fermentation d'un moût à 210 g de sucre par litre par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41, dans les deux conditions d'aération habituelles. Ces fermentations ont été conduites à 6 pH différents : 2,7 ; 3,2 ; 4,0 ; 5,0 ; 7,0 ; et 8,0. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII

Influence du pH sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin à 210 g de sucre par l fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre exprimé en g par l ; éthanal en mg par litre.

Temps en jours	pH 2,7		pH 3,2		pH 4,0		pH 5,0		pH 7,0		pH 8,0	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
Aérobiose												
2	34	69	38	72	38	67	32	54	—	—	—	—
4	120	83	130	95	118	84	104	82	26	32	—	—
6	184	103	186	107	180	123	162	81	100	96	62	112
11	—	—	—	—	—	—	—	—	139	86	108	110
Anaérobiose												
2	26	81	26	89	26	90	17	81	—	—	—	—
4	92	108	92	101	88	102	70	99	—	—	—	—
6	132	58	139	47	139	49	112	56	56	42	28	53
11	187	39	191	33	185	34	184	41	74	48	50	50
19	—	—	—	—	—	—	—	—	143	50	112	70

Nous constatons que dans l'intervalle de pH 2,7 à pH 5,0, la concentration en ions H^+ n'a pas d'influence nette sur l'évolution de l'éthanal. Mais à pH 7 et 8, les teneurs maxima en éthanal sont plus faibles qu'aux fortes acidités, au moins lorsqu'on considère la série fermentant en anaérobiose, car en milieu aéré les phénomènes d'oxydation sont certainement à l'origine d'une partie de l'éthanal. Nous avons vu pourtant que le taux de fermentation glycéropyruvique augmente avec le pH,

mais nous constatons ici que la vitesse d'utilisation de l'éthanal augmente encore plus rapidement. Une faible concentration en ions H^+ favorise en effet les mécanismes des fermentations secondaires et il y a en milieu alcalin augmentation du taux des produits secondaires, en particulier accumulation de l'acide acétique.

III. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Dans ces essais, nous avons fait fermenter un moût ayant 145 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans les deux conditions habituelles d'aération et à différentes températures : 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C. Nous avons suivi comme précédemment l'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII

Influence de la température sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin à 145 g de sucre fermenté
par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	15°C		20°C		25°C		30°C		35°C	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
					Aérobiose					
2	—	—	—	—	8	29	42	55	34	62
3	—	—	21	43	68	57	82	40	73	47
4	—	—	71	82	116	31	123	37	98	38
7	36	41	144	46	144	69	144	69	—	54
9	87	64	—	—	—	—	—	—	126	58
11	125	62	—	—	—	—	—	—	—	—
					Anaérobiose					
2	—	—	—	—	8	32	50	77	22	76
3	—	—	16	46	50	77	90	41	50	106
4	—	—	42	92	84	75	127	26	81	62
7	30	44	115	29	134	27	144	22	103	36
9	68	78	—	—	—	—	—	—	—	—
14	117	36	—	—	—	—	—	—	—	—

La température paraît n'avoir que peu d'influence sur la courbe d'évolution de l'éthanal ; il semble cependant qu'à 35°C, les teneurs en éthanal soient plus fortes au début de la fermentation, ce qui correspondrait à un taux plus élevé de fermentation glycéropyruvique. On ne peut pas mettre en évidence une variation régulière du taux d'éthanal libre avec la température.

L'élévation de la température semble agir de deux façons : elle augmente le taux de la fermentation glycéropyruvique et donc de l'éthanal libre, mais d'un autre côté elle favorise certaines réactions de formation des produits secondaires et a ainsi tendance à diminuer l'éthanal.

IV. — INFLUENCE DE LA TENEUR EN SUCRE

Nous avons fait fermenter deux milieux à différentes richesses en sucre et nous avons suivi l'évolution de la teneur en éthanal et la quantité de sucre fermenté. Nous avons opéré dans les deux conditions d'aération habituelles, avec un moût de raisin ajusté par des additions de saccharose à 200, 300 et 400 g par litre, et un milieu synthétique préparé avec 56, 110, 220, 350 et 450 g de saccharose par litre.

Les chiffres relatifs aux fermentations aérobies sont rassemblés dans les tableaux XIX et XX, les résultats des fermentations anaérobies étant illustrés par les courbes des figures 3 et 4.

Tableau XIX

Influence de la richesse en sucre sur l'évolution de l'éthanal.

Moût de raisin. Fermentation en aérobiose
par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 41.
Sucre exprimé en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	Teneurs en sucre au départ					
	200		300		400	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
2	36	65	35	79	13	82
3	75	46	56	101	46	138
4	102	46	75	80	66	142
6	147	50	122	70	112	107
8	188	53	157	64	143	85
11	—	—	204	59	175	73

La teneur en éthanal présente un maximum d'autant plus élevé, et même elle reste durant tout le cours de la fermentation d'autant plus élevée, que la richesse en sucre du milieu est plus grande. En d'autres termes, la fermentation d'une certaine quantité de sucre laisse dans le milieu d'autant plus d'éthanal que celui-ci est plus sucré. La pente de la courbe dans sa première partie est d'autant plus forte que la concentration initiale en sucre est plus grande.

On avait déjà observé que la somme des produits secondaires est plus importante en milieu plus sucré et qu'une forte teneur en sucre favorise la fermentation glycéroacétique et la condensation acétoïnique. Mais il semble aussi que l'éthanal s'accumule parce que la grande richesse en sucre freine l'utilisation de l'éthanal vers les produits secondaires.

TABLEAU XX

Influence de la richesse en sucre sur l'évolution de l'éthanal.

MILIEU SYNTHÉTIQUE. Fermentation en aérobiose.
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41.
Sucre exprimé en g, éthanal en mg par litre.

Temps en jours	Teneurs en sucre au départ									
	56		110		220		250		450	
	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal	Sucre fermenté	Éthanal
2	56	12	74	54	72	95	55	72	—	—
3	—	—	97	87	125	130	77	168	38	81
4	—	—	104	67	177	106	133	219	109	182
6	—	—	110	60	217	52	184	198	117	282
8	—	—	—	—	—	—	226	136	142	290
12	—	—	—	—	—	—	269	84	184	251
23	—	—	—	—	—	—	288	69	194	225

V. — INFLUENCE D'UN ENRICHISSEMENT EN THIAMINE ET D'UN ACTIVEUR DE FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

Nous avons étudié de la même façon l'influence sur l'évolution de l'éthanal dans un moût de raisin en fermentation d'une addition de thiamine et d'une addition de poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger*. Le moût avait au départ 145 g de sucre par litre. On opérait dans deux conditions d'aération. Une série de flacons servait de témoin, une autre recevait au départ 1 mg par litre de thiamine, et la troisième était additionnée de 1 g par litre d'activeur d'*Aspergillus*.

Les courbes de la figure 5 représentent l'évolution de l'éthanal libre en fonction du sucre fermenté.

Tout d'abord précisons que l'addition de vitamine B_1, mais surtout l'introduction du mycélium desséché, ont accéléré la fermentation : au troisième jour, l'avance est de 25 g pour B_1, de 50 g pour le mycélium. A l'abri de l'air, la fermentation n'a été complète que dans les fermentations activées ; le témoin est resté sucré.

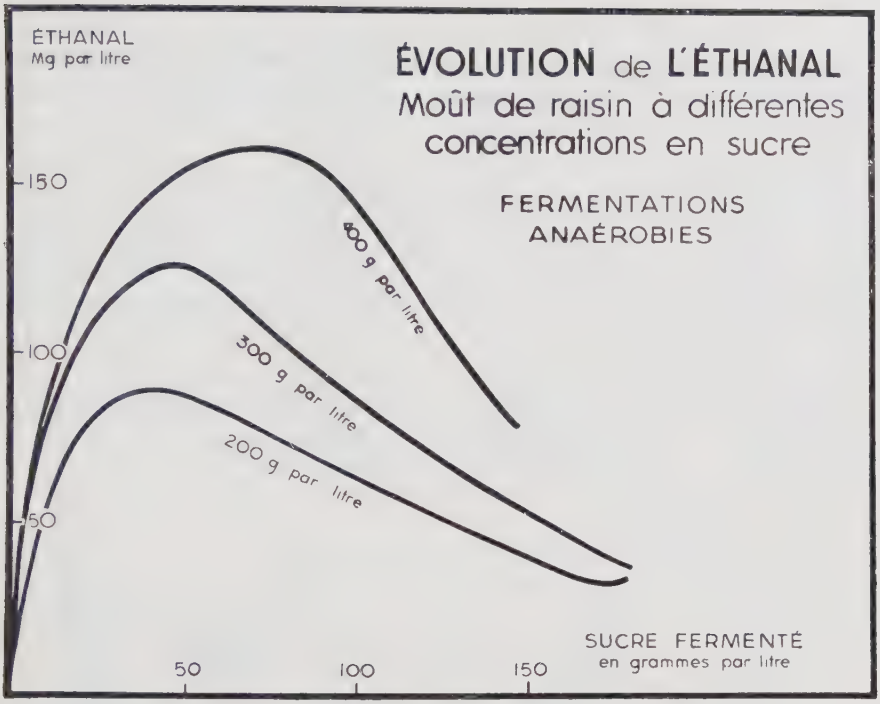

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
Moût de raisin à différentes concentrations en sucre
FERMENTATIONS ANAÉROBIES
150
100
50
400 g par litre
300 g par litre
200 g par litre
50
100
150
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 3

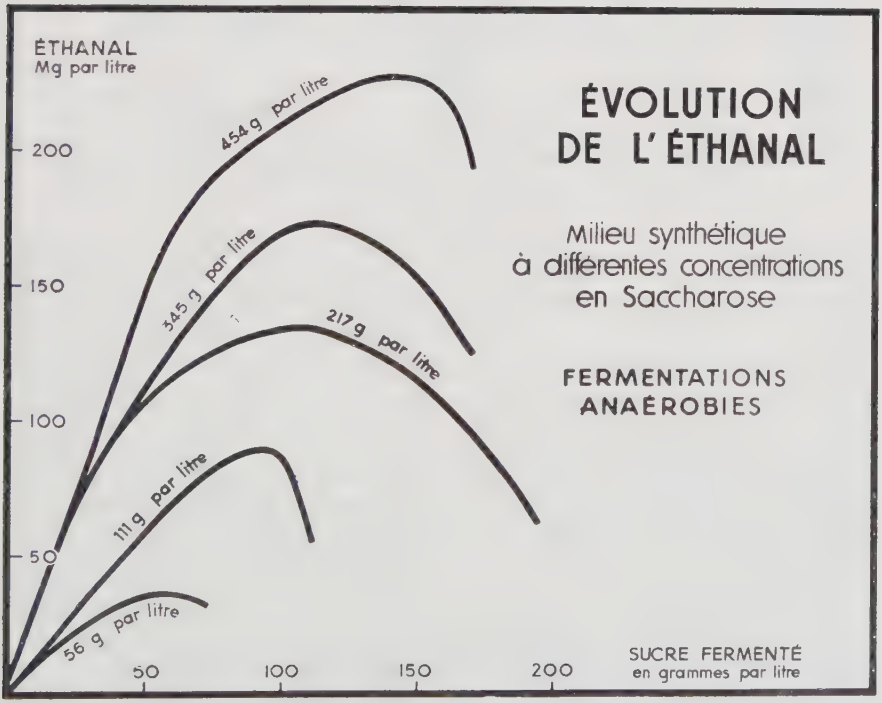

ÉTHANAL
Mg par litre
ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL
Milieu synthétique à différentes concentrations en Saccharose
FERMENTATIONS ANAÉROBIES
200
150
100
50
454 g par litre
345 g par litre
217 g par litre
111 g par litre
56 g par litre
50
100
150
200
SUCRE FERMENTÉ
en grammes par litre

FIG. 4

Nous voyons par ailleurs que la thiamine n'a pas eu d'effet sur l'évolution de l'éthanal ; les courbes des témoins et celles de la fermentation avec B_1 sont à peu près superposables. L'enrichissement du moût en vitamine B_1 ne modifie pas non plus la formation des produits secondaires. Ceci prouve que l'activité de la carboxylase du témoin, qui n'était pas dépourvu de thiamine, était largement suffisante.

La poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger* modifie au contraire profondément la courbe d'évolution de l'éthanal ; celle-ci monte plus brutalement au départ, ce qui correspond à une augmentation du taux de la fermentation glycéropyruvique, mais le maximum atteint est

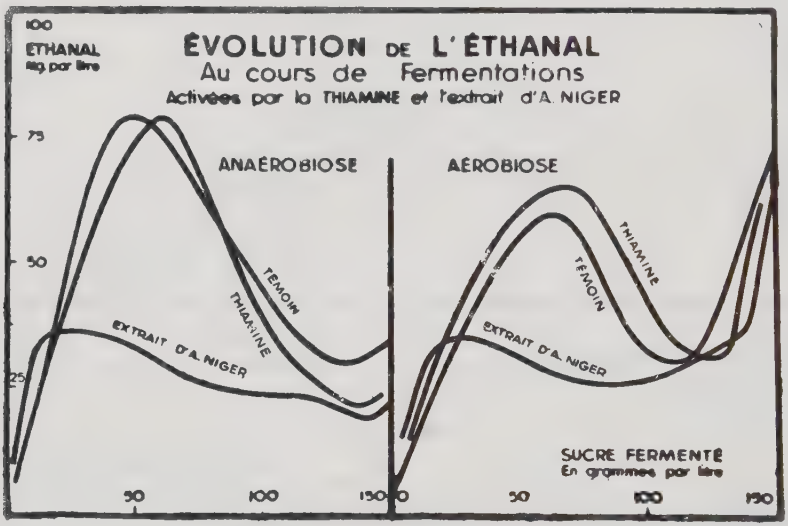


Fig. 5

très inférieur à celui du témoin : 34 mg par litre au lieu de 75 mg par exemple à l'abri de l'air. Puis la courbe présente un palier aux environs de 25 mg par litre. On remarque tout de suite que l'addition de cet activeur supprime la différence existant entre fermentations à l'air et à l'abri de l'air ; les deux courbes sont en effet pratiquement identiques et de même les variations des produits secondaires dues aux différences d'aération sont pratiquement supprimées en présence d'activeur. Cette poudre de mycélium contient certainement des enzymes qui, ajoutant leur action à ceux de la levure, augmentent la vitesse d'utilisation de l'éthanal et en conséquence diminuent la teneur en éthanal libre du milieu. De même on peut penser que les enzymes contenus dans cette poudre remplacent ceux qui manquent à la levure travaillant en anaérobiose et par suite suppriment les différences avec les fermentations à l'air.

VI. — ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION PAR TROIS ESPÈCES DE LEVURES

Nous avons également suivi les variations de la teneur en éthanal en fonction du sucre fermenté au cours de la fermentation d'un moût de raisin à 205 g de sucre par litre par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* déjà étudié et par deux autres levures appartenant à des genres différents : *Saccharomycodes bisporus* et *Torulaspora rosei*. Nous avons comparé ces levures, car au point de vue de la formation des produits secondaires, elles se différencient profondément. Le *Saccharomycodes* est une levure très succinogène et forme par contre peu d'acide acétique et très peu de 2,3-butanediol. *Torulaspora rosei* ne forme pratiquement pas d'acide acétique (tableau XXI).

Tableau XXI

Produits secondaires formés par les trois espèces de levures étudiées.

Moût de raisin, 205 g de sucre par litre.
Les chiffres sont des millimolécules par litre.

	Glycérol	Acide acétique	Acide succinique	2,3 butanediol	Éthanal	Σ	100	100	1 000
	g	*a*	*s*	*b*	*h*		Σ/*g*	*a*/*s*	*b*/*g*
Saccharomyces ellipsoïdeus									
Air	*102*	12,2	9,2	5,6	0,9	*77*	75	132	55
Abri de l'air	*80*	15,0	6,4	6,2	0,9	*69*	86	234	77
Saccharomycodes bisporus									
Air	*85*	9,2	17,2	1,6	1,2	*107*	125	53	188
Abri de l'air	*73*	3,6	13,5	1,3	0,8	*77*	104	27	178
Torulaspora rosei									
Air	*54*	0,6	11,5	4,3	1,2	*64*	118	5	80
Abri de l'air	*49*	0,6	8,8	3,0	0,4	*49*	100	7	61

Les chiffres obtenus dans les dosages successifs d'éthanal nous ont permis de tracer les courbes de la figure 6. Nous pouvons constater que ces trois levures se différencient nettement en ce qui concerne cette évolution.

En effet, au contraire de ce qui se passe pour *Saccharomyces ellipsoïdeus*, les deux autres levures forment davantage d'éthanal en aérobiose qu'à l'abri de l'air. Ces deux levures en forment d'ailleurs beaucoup moins que la levure elliptique. Les courbes obtenues sont plus aplaties, surtout

celles de *Torulaspora rosei*. Tout se passe comme si l'éthanal ou son précurseur était utilisé beaucoup plus rapidement par ces levures que par la levure elliptique.

Nous retrouvons en somme ici, en particulier chez le *Saccharomycodes*, des résultats que l'on peut rapprocher de ceux obtenus dans la fermentation activée par le mycélium d'*Aspergillus* : teneurs moins fortes en éthanal (qui paraissent correspondre à une utilisation plus rapide) et

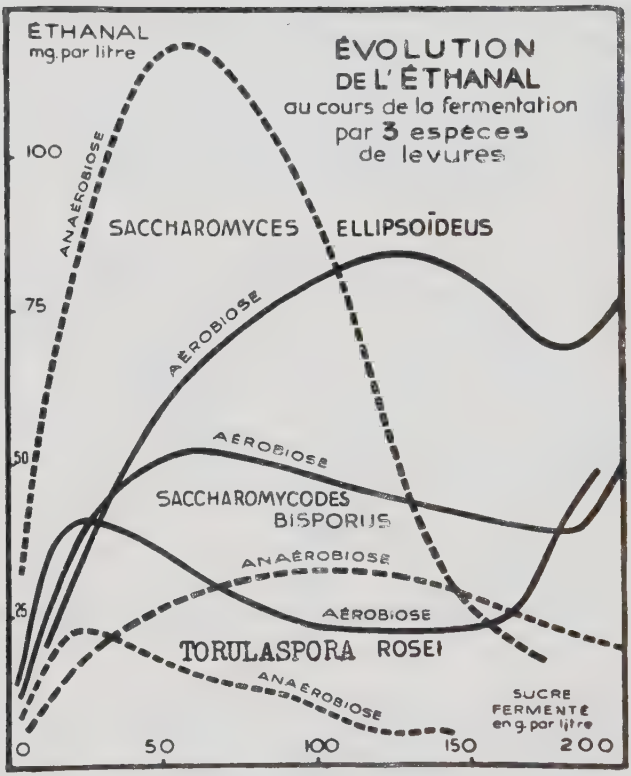


Fig. 6

formation plus élevée d'acide succinique. Il est à remarquer que les teneurs les plus fortes en acide succinique correspondent toujours aux cas où l'accumulation de l'éthanal est la plus faible. Il en est encore de même dans le cas de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, qui produit moins d'acide succinique lorsqu'il fermente en anaérobiose, condition dans laquelle il forme davantage d'éthanal. Ces faits sont en accord avec l'hypothèse qui fait découler l'acide succinique de l'éthanal et montrent qu'il se forme l'un des premiers parmi les produits secondaires.

VII. — CONCLUSIONS

En résumé, et nous y reviendrons plus longuement dans les conclusions générales, cette étude de l'évolution de l'éthanal au cours de fermentations conduites dans différentes conditions nous apporte des renseignements utiles. Certes l'éthanal n'apparaît qu'au bout de la chaîne des réactions et la seule connaissance de son évolution ne renseigne pas sur les mécanismes intimes. Mais ces observations sont en accord avec notre hypothèse sur le mode d'action des facteurs extérieurs de la fermentation qui favorisent électivement certaines réactions de formation des produits secondaires, donc orientent l'utilisation de l'éthanal. Elles confirment la distinction des deux phases de la fermentation : phase d'induction où le taux de la fermentation glycéropyruvique est très élevé, ce qui se traduit par une accumulation d'éthanal, et phase de pleine fermentation où ce taux diminue progressivement. Enfin, nous voyons la possibilité de faire varier les taux des produits secondaires en agissant sur la teneur en éthanal ou en acide pyruvique, possibilité qui est exploitée dans le chapitre suivant.

Chapitre V

FERMENTATIONS DÉVIÉES ET FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que les taux des produits secondaires de la fermentation alcoolique varient avec un grand nombre de facteurs. La relation quantitative établie au début de notre travail s'est révélée expérimentalement valable dans la plupart des cas, et l'étude de l'évolution de l'éthanal au cours de la fermentation nous a montré l'importance de ce corps dans ses relations avec les produits secondaires. Mais les équations chimiques de formation de ces derniers composés ne sont dans plusieurs cas que des équations globales, et le mécanisme de leur formation à partir de l'éthanal ou d'un de ses précurseurs n'est pas entièrement élucidé ; c'est en particulier le cas de l'acide succinique, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol.

Nous avons essayé d'éclairer ces problèmes en étudiant les modifications que provoque, dans la composition des liquides fermentés, l'incorporation d'éthanal ou d'acide pyruvique ou encore d'acide acétique, par exemple. Le sens de la déviation de fermentation obtenue permet des déductions sur les réactions impliquées.

On a vu qu'on peut faire remonter l'idée de cette forme d'expérimentation à J.-B. Dumas, qui proposait d'étudier la fermentation alcoolique en en modifiant les résultats par une action chimique quelconque. C'est en fixant, d'après ce principe, l'éthanal d'une fermentation par addition de sulfite de sodium ou de dimédon que Neuberg et Reinfurth (89) montrèrent l'équivalence entre glycérol et éthanal.

Plus récemment E. Peynaud (104) ajoutant progressivement de l'éthanal à une fermentation en marche, a montré que cette addition se traduisait par une augmentation des taux de 2,3-butanediol, d'acétoïne et des acides succinique et acétique et par une diminution du glycérol, fournissant ainsi une preuve de valeur à l'hypothèse de L. Genevois.

Nous avons repris cette expérience et nous avons également étudié les fermentations déviées par addition d'acide pyruvique, d'acide acétique et d'acide formique.

I. — ADDITIONS D'ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons fait fermenter à 25°C, un moût de raisin à 192 g de sucre par litre et de pH 3,61, dans les deux conditions d'aération plusieurs fois décrites. Une série de flacons servait de témoin, l'autre recevait au départ une addition de 84 mg par litre d'éthanal ; après le démarrage de la fermentation, on ajoutait progressivement de l'éthanal par doses de 300 à 600 mg par litre, plusieurs fois par jour au début, puis en espaçant les additions au fur et à mesure que l'activité de la fermentation diminuait. Chaque fois qu'une addition était faite les flacons témoins recevaient le même volume d'eau distillée stérile afin que la dilution finale soit la même. Nous avons ainsi ajouté 140 millimolécules d'éthanal par litre.

Afin d'évaluer les pertes possibles d'éthanal dues à un entraînement par le gaz carbonique dégagé, nous avons fait fermenter une troisième série de flacons que nous avions obturés d'un bouchon de liège paraffiné traversé d'un tube coudé à extrémité effilée, plongeant dans un flacon contenant de l'eau distillée et du bisulfite de sodium. Nous dosions tous les deux ou trois jours l'éthanal du barboteur, après distillation à pH 8. L'éthanal total entraîné de cette façon s'est révélé très faible : 0,21 mmol par litre pour le témoin et 0,18 mmol par litre pour le flacon recevant des additions d'éthanal. Les pertes d'éthanal par entraînement sont donc absolument négligeables dans le cas des fermentations à l'abri de l'air.

A la fin des fermentations, nous avons dosé les produits secondaires dans le liquide séparé du dépôt par décantation. Le tableau XXII expose les résultats obtenus pour les deux conditions d'aération. Dans les flacons additionnés d'éthanal, la proportion de la fermentation glycéropyruvique étant diminuée, nous avons calculé les taux des produits secondaires du témoin par rapport au glycérol de la fermentation déviée correspondante, de façon à ce que la différence de ces valeurs représente bien l'action de l'éthanal ajouté.

L'addition d'éthanal a pour résultat une augmentation de la formation d'alcool et de tous les produits secondaires, sauf du glycérol qui diminue. On le comprend aisément : la levure trouvant de l'éthanal dès le début de la fermentation, l'oxydoréduction normale de la réaction de Gay-Lussac débute beaucoup plus tôt et la phase d'induction pendant laquelle se forme la majorité du glycérol est réduite d'autant ; la fermentation normale est donc favorisée et il se forme davantage d'alcool. L'éthanal ajouté est utilisé par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires et donne un supplément de chacun d'eux.

Nous vérifions ainsi d'une façon probante que les produits secondaires : acétoïne, 2,3-butanediol, acide acétique et acide succinique déri-

vent de l'éthanal. Il est certain que l'acétoïne se forme, en gros, par condensation de deux molécules d'éthanal :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CHOH\,CO\,CH_3.$$

Notre expérience démontre nettement que l'acide acétique se forme à partir de l'éthanal par dismutation :

$$2CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH.$$

Enfin, nous avons la preuve que l'acide succinique dérive lui aussi de l'éthanal ; L. Genevois l'avait formulé en 1935 de la façon suivante :

$$5CH_3CHO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + 3CH_3CH_2OH.$$

Tableau XXII

Fermentations déviées par des additions d'éthanal

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf l'alcool et le sucre.

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 140 mmol d'éthanal	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 140 mmol d'éthanal	*Différence*
Sucre restant	2,9		3,5		3,2		37,4	
Alcool	11°8		12°2		11°75		10°4	
Alcool total	11°95		12°4	+ 0°45	11°8		12°5	+ 0°7
Glycérol (*g*)	86		69	— 17	83		64	— 19
Acide acétique (*a*)	13,9	11,1	30,4	+ 19,3	17,0	13,1	29,0	+ 15,9
Acide succinique (*s*)	8,0	6,4	10,9	+ 4,5	4,9	3,8	6,4	+ 2,6
Acétoïne (*m*)	1,8	1,4	6,0	+ 4,6	—	—	—	—
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,4	19,1	+ 15,7	5,5	4,2	15,6	+ 11,4
Éthanal (*h*)	5,6	4,5	4,0	— 0,5	1,4	1,1	7,5	+ 6,4
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide lactique	6,4		9,6	+ 3,2	8,7		12,0	+ 3,3
Acide citrique	1,4		1,7	+ 0,3	—	—	—	—

Nous essayerons de discuter le mécanisme possible de cette équation globale dans le chapitre suivant.

a) Bilan de l'éthanal

Du point de vue quantitatif, on peut essayer de faire un bilan de l'éthanal ajouté. Si l'on rapporte les teneurs en produits secondaires du témoin au taux de glycérol de la fermentation correspondante en présence d'éthanal, la somme $5\,\Delta s + 2\,\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\,\Delta m$ des différences entre témoin et fermentation déviée, représente une partie de l'éthanal ajouté. Le reste a donné de l'alcool éthylique : c'est la différence entre l'alcool formé réellement en plus et l'alcool équivalent à

la diminution du glycérol, une mmol de glycérol correspondant à 2 mmol d'alcool. Cette réduction d'une aldéhyde ajoutée à la fermentation en l'alcool correspondant est un fait d'expérience, démontré également par PELTIER et PEYNAUD mais l'origine de l'hydrogène nécessaire reste obscure.

1° Dans le cas des fermentations en aérobiose, nous avons :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\Delta m =$$
$$(5 \times 4{,}5) + (2 \times 19{,}3) + 15{,}7 - 0{,}5 + 9{,}2 = 86 \text{ mmol}$$

D'autre part, on calcule qu'une élévation du titre alcoolique de 0°45, correspond à la formation supplémentaire de 78 mmol d'éthanol. Or, 17 mmol de glycérol trouvées en moins correspondent à une formation d'éthanol plus faible de 34 mmol ; l'éthanol formé à partir de l'éthanal ajouté par les réactions qui ont donné naissance à l'excès de produits secondaires est égal à : $3\,\Delta s + \Delta a - \Delta b$, soit $(3 \times 4{,}5) + 19{,}3 - 15{,}7 = 17{,}1$ mmol. Enfin dans la fermentation témoin il s'est formé plus de glycérol que dans la fermentation déviée, donc plus de produits secondaires et en même temps d'éthanol correspondants à cet excès de glycérol ; cette petite quantité d'éthanol est égale à $3\tilde{\Delta}s + \tilde{\Delta}a - \tilde{\Delta}b = (3 \times 1{,}6) + 2{,}8 - 0{,}9 = 6{,}7$ mmol.

L'alcool dû à l'éthanal ajouté est donc :

$$78 - 34 - 17{,}1 + 6{,}7 = 34 \text{ mmol.}$$

L'éthanal retrouvé sur 140 mmol ajoutées, est :

$$86 + 34 = 120 \text{ mmol.}$$

Il y a un déficit qui peut être dû à une évaporation au contact de l'air.

2° En anaérobiose, si l'on applique le même calcul, 63 mmol d'éthanal se retrouvent dans l'excédent de formation des produits secondaires :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h = (5 \times 2{,}6) + (2 \times 15{,}9) + 11{,}4 + 6{,}4 = 63 \text{ mmol.}$$

D'autre part, l'élévation du degré alcoolique total (alcool + sucre) de 0°7, soit 122 mmol, se répartit de la façon suivante : 39 mmol résultent de la diminution dans la formation de glycérol et 12,3 mmol proviennent de l'éthanal introduit qui forme un excès de produits secondaires ; la fermentation témoin avait une quantité supplémentaire d'alcool de 5,9 mmol correspondant à la formation des produits secondaires équivalents à l'excès de glycérol.

L'alcool dû à l'éthanal ajouté est donc :

$$122 - 39 - 12{,}3 + 5{,}9 = 77 \text{ mmol}$$

et l'éthanal retrouvé est :

$$63 + 77 = 140 \text{ mmol}$$

c'est-à-dire que nous retrouvons les 140 mmol d'éthanal ajoutées.

Il faut reconnaître que la difficulté d'un dosage assez précis de l'alcool éthylique ne permet pas d'avoir une confiance absolue en ces bilans.

b) Formation d'acide citrique

Nous constatons que le taux d'acide citrique augmente par addition d'éthanal, ce qui prouve bien que cet acide se forme à partir de ce corps ou d'un de ses précurseurs. L'hypothèse actuellement admise pour l'acide citrique de fermentation produit par les moisissures est qu'il provient de la condensation d'un dérivé acétyle « actif » avec l'acide oxalacétique formé par carboxylation de l'acide pyruvique :

$$CH_3COOH + COOH\,CH_2\,CO\,COOH \rightarrow \begin{array}{l} CH_2 - COOH \\ | \\ HOC - COOH \\ | \\ CH_2 - COOH \end{array}$$

Si l'on adopte le même mode de formation pour la levure, qui contient les enzymes nécessaires, sa variation interviendrait dans les calculs de notre bilan affectée du coefficient 3. La formation supplémentaire de 0,3 mmol, si elle est fort importante au point de vue théorique, n'a pratiquement pas d'incidence sur le bilan de l'éthanal ajouté.

c) Formation d'acide lactique

Il se forme davantage d'acide lactique dans les fermentations où l'on a ajouté de l'éthanal. Si l'on admet avec Kiessling (56) que l'acide lactique se forme par simple hydrolyse de la phosphoglycéraldéhyde :

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OPO_3H_2 \end{array} + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} + PO_4H_3$$

on peut penser que l'addition d'éthanal ralentissant la fermentation glycéropyruvique qui met en jeu deux molécules de phosphoglycéraldéhyde au lieu d'une dans la fermentation normale, facilite de cette façon sa transformation en acide lactique. Citons encore à l'appui de cette hypothèse notre observation que l'addition de l'activeur d'*Aspergillus niger* augmente le taux d'acide lactique ; or, cet activeur agit en augmentant le taux des triosephosphates, phosphoglycéraldéhyde et phosphodihydroxyacétone. De plus, on observe d'après les chiffres de Kiessling et ceux de Peynaud (101), que l'acide lactique se forme un peu plus vite en fin de fermentation, au moment donc où les triosephosphates disparaissent du milieu.

On pourrait également penser que l'acide lactique se forme par simple réduction de l'acide pyruvique :

$$CH_3\ CO\ COOH + H_2 \rightarrow CH_3\ CHOH\ COOH$$

L'addition d'éthanal pourrait agir en ralentissant la décarboxylation de cet acide, donc en favorisant sa réduction.

Deux faits paraissent s'opposer à cette interprétation : en premier lieu l'addition d'acide pyruvique à une fermentation, que nous étudions en détail dans le paragraphe suivant, n'a pas plus d'effet sur le taux d'acide lactique que l'addition d'éthanal, au contraire même, alors qu'elle devrait l'augmenter fortement. D'autre part, nous avons dosé l'acide lactique dans des fermentations activées par la thiamine. Nous n'avons pas observé de diminution de l'acide lactique, mais plutôt une légère augmentation. Il nous paraît donc plus probable que l'acide lactique dérive de la phosphoglycéraldéhyde.

II. — ADDITIONS D'ACIDE PYRUVIQUE AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons conduit parallèlement à l'expérience précédente un essai dans lequel nous ajoutions progressivement du pyruvate de sodium et, afin de ne pas modifier le pH, la quantité d'acide sulfurique juste nécessaire pour libérer l'acide pyruvique. Nous avions les mêmes témoins et opérions dans les mêmes conditions de température, d'aération et avec les mêmes levures. Les flacons de cet essai recevaient avant le départ de la fermentation, 482 mg par litre de pyruvate de sodium. Après le départ de la fermentation, nous ajoutions 500 à 900 mg par litre de pyruvate, plusieurs fois par jour en période de pleine fermentation, puis moins fréquemment à mesure que l'activité de la fermentation diminuait. Le témoin recevait les mêmes volumes d'eau distillée stérile. Nous avons ainsi ajouté 83 mmol par litre d'acide pyruvique dans les deux essais, à l'air et à l'abri de l'air.

Ici encore l'éthanal entraîné par le dégagement du gaz carbonique dans un essai parallèle en barboteur a été tout à fait négligeable.

A la fin de la fermentation, nous avons dosé les divers produits secondaires sur le liquide décanté. Les résultats sont exposés dans le tableau XXIII. Nous y faisons également figurer les produits secondaires du témoin rapportés au taux de glycérol de la fermentation déviée.

Nous constatons que l'effet d'une addition d'acide pyruvique est de même sens que celui de l'addition d'éthanal, mais moins important. La quantité introduite était d'ailleurs plus faible. L'augmentation du degré alcoolique est moins élevée que lorsqu'on ajoute de l'éthanal. La diminution du glycérol et les augmentations des autres produits secondaires sont également plus faibles.

Qualitativement, on peut dire que tout se passe comme si l'acide pyruvique ajouté était décarboxylé en éthanal ; son addition revient à une addition d'éthanal. Elle favorise la fermentation de GAY-LUSSAC et la formation de produits secondaires dérivés de l'éthanal.

TABLEAU XXIII

Fermentations déviées par des additions d'acide pyruvique

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf l'alcool et le sucre.

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 83 mmol d'acide pyruvique	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au *g* de la fermentation déviée	+ 83 mmol d'acide pyruvique	*Différence*
Sucre restant	2,9		6,4		3,2		45,3	
Alcool	11°8		12°05		11°75		9°8	
Alcool total	11°95		12°4	+ 0°45	11°90		12°3	+ 0°4
Glycérol (*g*)	86		69	— 17	83		74	— 9
Acide acétique (*a*)	13,9	11,1	20,8	+ 9,7	17,0	15,0	21,8	+ 6,8
Acide succinique (*s*)	8,0	6,4	10,0	+ 3,6	4,9	4,3	6,6	+ 2,3
Acétoïne (*m*)	1,8	1,4	2,5	+ 1,1	1,6	1,4	3,4	+ 2,0
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,4	7,5	+ 4,1	5,5	4,9	8,2	+ 3,3
Éthanal (*h*)	5,6	4,4	4,7	+ 0,3	1,4	1,2	3,2	+ 2,0
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide lactique	6,4		8,8	+ 2,4	8,7		7,7	— 1,0
Acide citrique	1,4		1,8	+ 0,4	1,3		1,8	+ 0,5

Bilan de l'acide pyruvique. — Si l'on établit le bilan quantitatif de l'acide pyruvique ajouté, comme cela a été fait pour l'éthanal, on trouve des résultats satisfaisants.

Dans le cas de la fermentation en milieu aéré, la somme des produits secondaires correspondant à l'acide pyruvique est :

$$5\Delta s + 2\Delta a + \Delta b + \Delta h + 2\Delta m =$$
$$(5 \times 3{,}6) + (2 \times 9{,}7) + 4{,}1 + 0{,}3 + (2 \times 1{,}0) = 44 \text{ mmol.}$$

En y ajoutant la petite quantité d'acide citrique qui provient directement de l'acide pyruvique, cette somme devient 45 mmol environ. Or l'augmentation de 0°45 d'alcool, soit 78 mmol, s'explique pour 34 mmol par un taux de fermentation glycéropyruvique plus faible et pour 16,5 mmol par les réactions de formation de produits secondaires à partir de l'acide pyruvique ; il faut ajouter à cette augmentation d'alcool 6,5 mmol formées en plus dans la fermentation témoin en même temps que des produits secondaires équivalents à l'excès de glycérol.

L'alcool dû à l'acide pyruvique est finalement égal à 34 mmol et l'acide pyruvique retrouvé est 45 + 34 = 79 mmol, chiffre peu différent des 83 mmol ajoutées.

Dans le cas de la fermentation anaérobie, les mêmes calculs permettent de retrouver 80 mmol des 83 mmol d'acide pyruvique ajoutées.

Quoi qu'il en soit de la rigueur de ces bilans, ces expériences apportent la preuve formelle que l'acide pyruvique et l'éthanal sont bien, selon notre hypothèse de travail, les précurseurs des produits secondaires dans le milieu fermenté. La filiation a été établie pour l'acide citrique. L'étude suivante de la fermentation en présence d'acides gras volatils a pour but de préciser les produits formés intermédiairement, et doit permettre de tirer des conclusions sur les réactions mises en jeu.

III. – FERMENTATIONS EN PRÉSENCE D'ACIDES GRAS VOLATILS

a) Addition d'acide acétique

Nous avons conduit cet essai selon les modalités des deux expériences précédentes. Les témoins étaient du reste communs aux différentes variables et les fermentations avaient lieu parallèlement, à 25°C, dans deux conditions d'aération.

Une série de flacons recevait, avant le départ de la fermentation, 39,5 mmol par litre d'acide acétique ; les flacons témoins recevaient le même volume d'eau distillée stérile. Nous avons observé que l'addition d'acide acétique en petites quantités accélérait la marche de la fermentation ; des doses plus fortes la retardent. Après l'arrêt de la fermentation, nous avons dosé les produits secondaires dans le liquide après décantation ; les chiffres obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIV.

Nous avons évalué ici encore, dans des fermentations parallèles sous barboteur, l'éthanal entraîné par le dégagement du gaz carbonique ; nous en avons trouvé 0,29 mmol par litre, soit une quantité qui ne saurait entrer en ligne de compte.

Nous remarquons que la formation d'alcool est plus élevée dans les fermentations en présence d'acide acétique ; le taux de glycérol, au contraire, y est plus faible. Seuls les produits butanedioliques ont subi une augmentation. Nous avons rapporté comme précédemment les produits secondaires du témoin au glycérol de la fermentation déviée, afin d'essayer d'exprimer quantitativement le sort de l'acide acétique.

J. Ventre (142) avait déjà observé en 1937 que les acides volatils ajoutés au moût diminuent pendant la fermentation en anaérobiose. E. Peynaud (105) pensait que l'acide acétique ajouté au départ était réduit en alcool éthylique ; en ajoutant au moût de l'acide propionique ou de l'acide butyrique, cet auteur trouvait à la fin de la fermentation, un taux plus élevé d'alcools supérieurs.

La diminution très nette du glycérol dans notre expérience montre qu'en réalité le phénomène est plus complexe. L'interprétation la plus

immédiate semble être une réduction de l'acide acétique en éthanal favorisant la fermentation normale au détriment de la fermentation glycéropyruvique et provoquant la formation de produits secondaires supplémentaires ; l'addition d'acide acétique reviendrait dans ce cas à une addition d'éthanal. On comprendrait ainsi pourquoi de faibles doses d'acide acétique accélèrent la fermentation.

TABLEAU XXIV

Fermentations déviées par addition d'acide acétique

	Aérobiose				Anaérobiose			
	Témoin	Chiffres rapportés au glycérol de la fermentation déviée	+ 39,5 mmol acide acétique	*Différence*	Témoin	Chiffres rapportés au glycérol de la fermentation déviée	+ 39,5 mmol acide acétique	*Différence*
Sucre	2,9		2,8		3,2		5,5	
Alcool	11°8		11°85		11°75		11°95	
Alcool total	11°95		12°0	+ 0°05	11°9		12°25	+ 0°35
Glycérol (*g*)	86,4		64,7	— 21,7	83,6		65,6	— 18,0
Acide acétique (*a*)	13,9	10,4	39,8	+ 29,4	17,0	13,3	40,4	+ 27,1
Acide succinique (*s*)	8,0	6,0	6,4	+ 0,4	4,9	3,8	4,9	+ 1,1
Acétoïne (*m*)	1,8	1,3	2	+ 0,7	1,6	1,3	1,7	+ 0,4
2,3-butanediol (*b*)	4,3	3,2	6,8	+ 3,6	5,5	4,3	6,8	+ 2,5
Éthanal (*h*)	5,6	4,2	4,0	— 0,2	1,4	1,1	1,3	+ 0,2
Σ	81				69			
100 Σ/*g*	94				82			
Acide acétique pratiquement disparu (1)			13,6				16,1	
Acide acétique formé d'après *g*			7,0				8,9	
Acide acétique théorique total			46,5				48,4	
Acide acétique réellement disparu			6,7				8,0	
Acide lactique	6,4		9,6	+ 3,2	8,7		12,2	+ 3,5
Acide citrique	1,4		1,7	+ 0,3	1,3		1,5	+ 0,2

(1) (Acide acétique formé dans le témoin + 39,5) — Acide acétique à la fin de la fermentation.

Nous avons essayé de vérifier quantitativement cette hypothèse. Pour cela il était nécessaire de connaître l'acide acétique formé dans la fermentation déviée et l'acide acétique réellement disparu.

Ces calculs ne peuvent être qu'approximatifs ; nous avons calculé l'acide acétique formé en supposant que $\Sigma = 0{,}94\ g$, comme dans le cas du témoin

$$a = \frac{0{,}94\ g - (5\ s + b + 2\ m + h)}{2}.$$

L'acidité volatile théorique totale est la somme de cette valeur et de l'acide acétique ajouté au départ, et l'acidité volatile réellement disparue

s'obtient en retranchant de l'acidité volatile théorique totale, l'acide acétique trouvé par dosage.

Mais si l'on essaie à partir des chiffres obtenus de faire le bilan comme dans le cas d'une addition d'éthanal, on s'aperçoit que notre hypothèse ne paraît pas du tout se vérifier, même en anaérobiose. Nous avons donc cherché à préciser et à expliquer cette expérience par deux autres séries d'essais.

b) Évolution de l'éthanal et de l'acide acétique dans des fermentations en présence d'acide acétique

Nous avons dosé l'éthanal et les acides volatils au cours de la fermentation, par deux souches de *Saccharomyces ellipsoïdeus*, d'un moût ayant

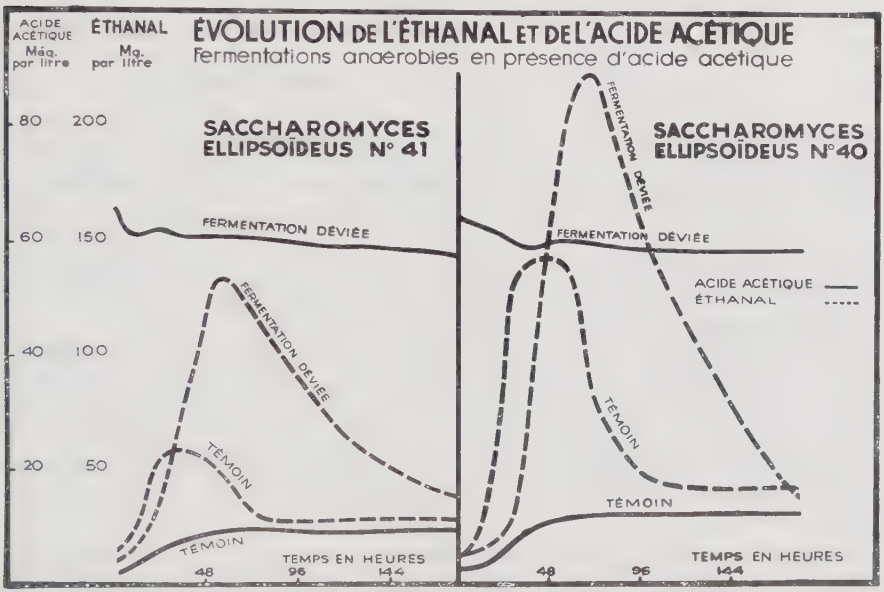


Fig. 7

170 g de sucre par litre. Les fermentations étaient conduites à 25°C, en anaérobiose obtenue par un dispositif à tube effilé. Une série de flacons a servi de témoin et l'autre a reçu avant le départ de la fermentation 64 mmol d'acide acétique par litre.

Les chiffres obtenus permettent de tracer les courbes d'évolution de l'éthanal et de l'acide acétique en fonction du temps (fig. 7).

Les courbes d'acide acétique des fermentations déviées présentent d'abord une légère chute correspondant à une utilisation de l'acide ajouté au départ ; puis la courbe passe par un minimum à peine marqué et se stabilise. L'allure de cette courbe est la résultante de la disparition

de l'acide acétique et de sa formation, mais le minimum d'acide acétique ne correspond pas en général au maximum d'éthanal.

La considération de l'évolution de l'éthanal en fonction du temps montre que la courbe de la fermentation en présence d'acide acétique présente un maximum considérablement plus élevé que la courbe du témoin : 136 mg au lieu de 55 pour la levure n° 41, 218 au lieu de 145 pour la levure n° 40. Par contre, la différence des taux d'éthanal en fin de fermentation est faible. La teneur plus grande en éthanal libre a pour conséquence une formation légèrement plus élevée de produits secondaires, comme nous l'avons déjà vu et une formation plus importante d'alcool. S'il y a davantage d'éthanal libre, cette expérience ne prouve pas qu'il provienne de la réduction de l'acide acétique ajouté. On peut aussi bien penser que l'acide acétique inhibe une ou plusieurs diastases d'utilisation de l'éthanal et provoque ainsi son accumulation.

c) **Fermentation en présence d'acide formique**

Si l'on répète les deux expériences précédentes en ajoutant de l'acide formique au moût au lieu d'acide acétique, il sera possible de voir par dosage direct si cet acide est réduit en formol ou en méthanol, de suivre la formation d'acide acétique et la disparition de l'acide formique et d'essayer d'en faire un bilan. On pourra par analogie en déduire des conclusions relatives à l'utilisation de l'acide acétique.

Nous avons donc fait fermenter un moût de raisin à 200 g de sucre par litre et de pH 3,36 par deux levures *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans deux conditions d'aération. Nous avions deux séries de flacons dans chacune de ces conditions : l'une servait de témoin et l'autre recevait avant le départ de la fermentation 40 mmol d'acide formique par litre.

Nous avons suivi durant la fermentation les teneurs en éthanal, en acide formique, en acide acétique, en formol et bien entendu en sucre, ce qui nous a permis de tracer les courbes d'évolution des trois premiers de ces corps en fonction du sucre fermenté (fig. 8 et 9). A la fin de la fermentation, nous avons dosé dans le liquide séparé du dépôt de levures, les produits secondaires habituels et le méthanol.

Il ne se forme pratiquement pas de formol, à aucun moment de la fermentation ; donc l'acide gras volatil ajouté à une fermentation n'est pas transformé par réduction en l'aldéhyde correspondante. Les courbes de l'évolution de l'éthanal en fonction du sucre fermenté, accusent ici aussi, comme dans le cas où l'acide introduit est l'acide acétique, une accumulation d'éthanal dans la fermentation déviée. Cet éthanal ne pouvant pas provenir de la réduction de l'acide ajouté, il faut admettre

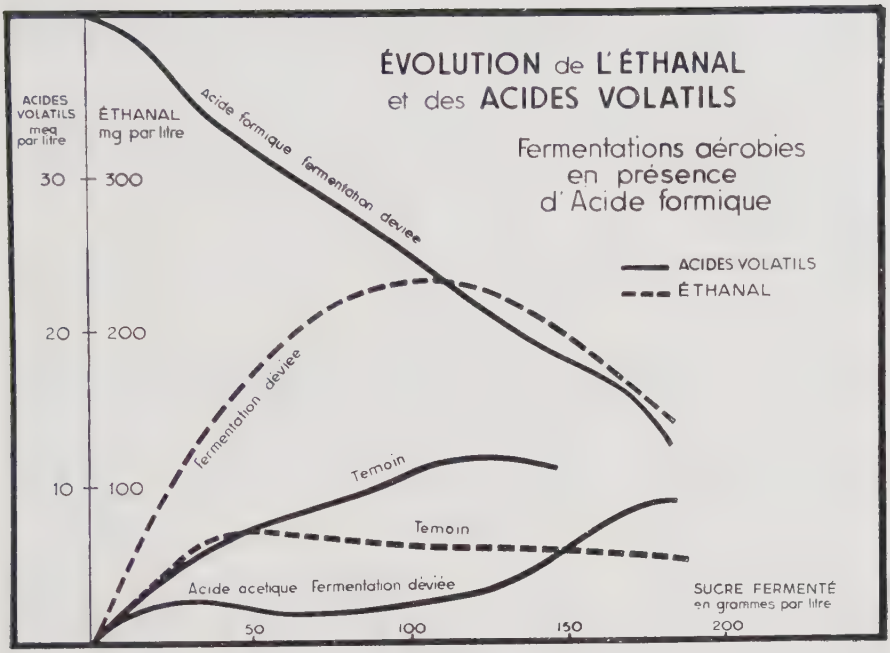

ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
et des ACIDES VOLATILS
Fermentations aérobies
en présence
d'Acide formique
ACIDES VOLATILS
ÉTHANAL
ACIDES VOLATILS meq par litre
ÉTHANAL mg par litre
30 300
20 200
10 100
Acide formique Fermentation déviée
Fermentation déviée
Témoin
Témoin
Acide acetique Fermentation déviée
SUCRE FERMENTÉ en grammes par litre
50
100
150
200

FIG. 8

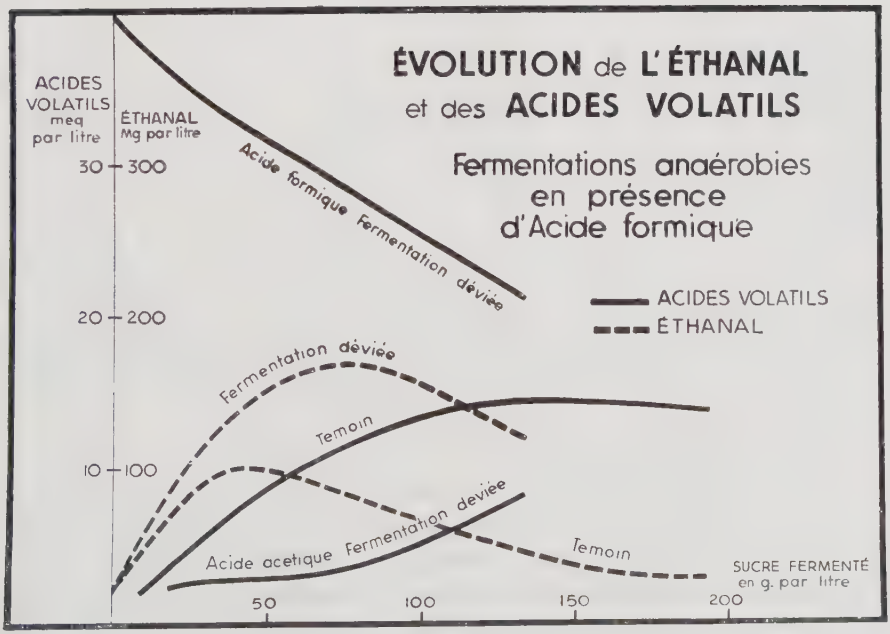

ÉVOLUTION de L'ÉTHANAL
et des ACIDES VOLATILS
Fermentations anaérobies
en présence
d'Acide formique
ACIDES VOLATILS
ÉTHANAL
ACIDES VOLATILS meq par litre
ÉTHANAL Mg par litre
30 300
20 200
10 100
Acide formique Fermentation déviée
Fermentation déviée
Témoin
Acide acetique Fermentation déviée
Témoin
SUCRE FERMENTÉ en g. par litre
50
100
150
200

FIG. 9

que son accumulation est due à l'inhibition d'une ou plusieurs réactions d'utilisation par l'acide formique présent. L'acide formique lui-même diminue d'une manière continue.

Les courbes relatives à l'acide acétique montrent que sa formation est très réduite au début de la fermentation déviée. La présence d'un acide volatil inhibe la formation d'acide acétique au début de la fermentation. En somme on peut dire que l'éthanal, qui normalement donne de l'acide acétique, s'accumule jusqu'à ce que les autres réactions secondaires l'utilisent et que la teneur en acide formique soit devenue assez

TABLEAU XXV

Produits secondaires de fermentations en présence d'acide formique
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 81

Les chiffres sont des mmol par litre, sauf le sucre et l'alcool

	Aérobiose		Anaérobiose	
	Témoin	+ 40 mmol H COOH	Témoin	+ 40 mmol H COOH
Sucre	2,0	95	10,2	108
Alcool éthylique	10°9	6°4	11°3	6°3
Alcool éthylique total	11°0	11°7	11°9	12°3
Alcool méthylique (mmol)	1,0	2,0	0,6	2,8
Glycérol (*g*)	*109*	*46*	*71*	*30*
Acide acétique (*a*)	8,0	7	9,2	5,5
Acide formique	—	31,7	—	36,7
Éthanal (*h*)	1,2	3,3	1,4	3,0
Acide succinique (*s*)	9,4	4,3	5,8	3,5
Acétoïne (*m*)	0,3	3,5	0,5	1,9
2,3-butanediol (*b*)	6,5	8,2	7,9	6,1
Σ	*71*	*54*	*58*	*40*
100 Σ/*g*	65	117	82	133
Formol	1,3	2,4	0,6	0
Acide lactique	3,6	2,3	3,6	3,4
Acide citrique	0,9	0,9	1,0	0,9

faible pour permettre la formation d'acide acétique. Ceci est corroboré par le fait que la chute de la teneur en éthanal après le maximum est plus brusque dans le cas des fermentations en présence d'acide formique.

Les tableaux XXV et XXVI exposent les teneurs des produits secondaires en fin de fermentation.

Nous constatons une diminution du glycérol, de l'acide succinique et de l'acide acétique et au contraire une augmentation en général assez considérable des produits butanedioliques. La production d'alcool éthylique augmente et il se forme aussi un peu plus d'alcool méthylique. Nous retrouvons donc dans les grandes lignes, les mêmes résultats que dans l'expérience d'addition d'acide acétique.

TABLEAU XXVI

Produits secondaires de fermentations en présence d'acide formique
Saccharomyces ellipsoïdeus n° 41

Les chiffres sont des mmol, sauf le sucre et l'alcool

	Aérobiose		Anaérobiose	
	Témoin	+ 40 mmol H COOH	Témoin	+ 40 mmol H COOH
Sucre	1,7	17	6,4	66
Alcool éthylique	10°7	9°8	11°7	8°0
Alcool éthylique total	10°8	10°8	12°0	11°7
Alcool méthylique (mmol)	1,5	2,1	1,7	3,6
Glycérol (*g*)	*102*	*74*	*74*	*54*
Acide acétique (*a*)	10,6	8,7	13,7	8,2
Acide formique	—	12,7	—	21,2
Éthanal (*h*)	2,9	3,1	1,1	2,7
Acide succinique (*s*)	8,1	5,6	5,1	2,4
Acétoïne (*m*)	0,6	8,1	0,6	6,0
2,3-butanediol (*b*)	6,1	16	7,4	9,7
Σ	*72*	*81*	*63*	*53*
100 Σ/*g*	70	109	85	97
Formol	1,5	0,6	0,5	0,9
Acide lactique	3,2	3,6	2,4	2,8
Acide citrique	1,0	1,0	1,0	0,8

d) **Discussion**

Plusieurs résultats importants ressortent des expériences précédentes.

1. — L'addition d'acide acétique provoque une diminution de l'acide succinique ; si on tient compte de ce que la formation de tous les produits secondaires est réduite par suite de la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique et considère le chiffre du témoin rapporté au glycérol de la fermentation déviée, on constate qu'il y a dans cette dernière un peu plus d'acide succinique ; ce résultat, que nous avons retrouvé dans d'autres expériences de fermentation en présence d'acide acétique, n'est pas assez net pour fournir une preuve à l'hypothèse qui explique la formation anaérobie d'acide succinique par une déshydrogénation de deux molécules d'acide acétique :

$$2CH_3\ COOH \xrightarrow{-2H} COOH\ CH_2\ CH_2\ COOH$$

(Cependant cette hypothèse recevra plus loin une confirmation dans les expériences de fermentation en présence d'acétate marqué).

2. — Le glycérol subit une diminution très nette, 20 à 30 p. 100. Il y a donc diminution du taux de la fermentation glycéropyruvique. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation d'éthanal en présence d'un acide volatil ; la phase d'induction est écourtée et le cycle de GAY-LUSSAC est activé aux dépens de la fermentation glycéropyruvique.

3. — Par suite de la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique, il doit y avoir moins de produits secondaires dans la fermentation déviée. Ceci est exact pour l'acide succinique et l'acide acétique, mais les produits butanedioliques, au contraire, sont augmentés, surtout en présence d'acide formique. Le taux de ces produits est d'autant plus élevé qu'il y a davantage d'acide formique utilisé.

4. — La teneur en acide acétique est restée à peu près stationnaire dans les fermentations en présence d'acide acétique. En présence d'acide formique on peut suivre la marche de sa formation ; on constate en gros qu'elle est freinée pendant un certain temps, en général pendant la fermentation de 35 à 100 g de sucre, puis elle repart. Cette période de freinage semble correspondre à l'accumulation d'éthanal. On peut penser qu'il y a entre les deux phénomènes une relation de cause à effet et que la formation moindre d'acide acétique est responsable de l'accumulation d'éthanal.

5. — Le taux d'acide formique diminue d'une façon d'ailleurs très variable avec la souche de levure. Or, il ne donne pas de formol et très peu de méthanol. La disparition de 20 à 25 mmol d'acide formique ne donne que 1 à 2 mmol supplémentaires de méthanol. Il faut donc penser qu'il est transformé en produits secondaires, plus précisément en produits butanedioliques, dont nous avons vu que la formation est très augmentée. Le bilan des produits secondaires montre d'ailleurs que Σ est plus élevé en présence d'acide formique et que Σ/g est souvent plus grand que 1, ce qui est une preuve directe de l'utilisation de l'acide formique pour la formation de certains produits secondaires.

6. — La formation d'acide lactique est légèrement plus élevée surtout en présence d'acide acétique. On peut expliquer ce fait de la même façon que dans le cas des fermentations en présence d'éthanal.

7. — Les expériences de fermentation en présence d'acide formique ne montrent pas que l'acide citrique se forme à partir de cet acide, comme le pense Gobis (38). Nous avons vu qu'il dérive du sucre et même plus précisément de l'acide pyruvique et de l'éthanal.

Nous essaierons d'interpréter ces résultats très importants.

Cas d'une addition d'acide acétique. La réaction qui dans une fermentation ordinaire forme l'acide acétique est une dismutation :

$$2CH_3\,CHO + H_2O \rightleftarrows CH_3\,COOH + CH_3\,CH_2\,OH$$

Elle est catalysée par l'aldéhydomutase. L'éthanal se formant constamment au cours de la fermentation normale, l'équilibre est sans cesse rompu et la réaction donne de l'acide acétique. Mais la présence d'un gros excès d'acide acétique empêche cette formation par le mécanisme inverse. Dans ces conditions, il ne se formerait pas d'acide acétique ou très peu et l'éthanal habituellement dismuté s'accumulerait au début.

Puis l'éthanal est utilisé et nous constatons qu'il se forme surtout davantage de produits butanedioliques que dans la fermentation normale. L'acide acétique semble être une sorte de catalyseur de leur formation. Nous interprétons ces faits dans le chapitre VII. Nous pensons qu'il est possible qu'aient lieu les réactions suivantes : condensation d'une molécule d'acide acétique avec une molécule d'éthanal pour donner du diacétyle ; cette réaction serait catalysée par le système carboxylasique ; elle serait suivie d'une oxydoréduction entre le diacétyle et l'éthanal qui conduit à l'acétoïne, tandis que l'acide acétique est régénéré.

La teneur en alcool, légèrement plus forte en présence d'acide acétique, est la résultante de l'augmentation du taux de la fermentation normale au détriment de la fermentation glycéropyruvique et de l'utilisation de l'éthanal par le mécanisme précédent. L'acide acétique subit quelquefois une légère diminution, une faible partie est peut-être réduite en alcool comme nous l'avons vu pour l'acide formique et comme l'indiquait E. PEYNAUD.

Cas d'une addition d'acide formique. L'action de l'acide formique est plus difficile à interpréter. Il semble que l'acide formique soit lui aussi à l'origine d'une partie des produits butanedioliques. D'autre part la faible teneur en glycérol dans le milieu fermenté par *Saccharomyces ellipsoïdeus* n° 81 en présence d'acide formique, alors qu'une très faible quantité de cet acide seulement a été utilisée, peut être due à l'accumulation dans ce cas d'un corps hydrogéné autre que le glycérol et encore inconnu.

L'addition d'acide formique produit, nous l'avons vu, une accumulation d'éthanal qui semble correspondre à un ralentissement de la formation d'acide acétique. On peut penser que la présence d'acide formique gêne, sans l'inhiber complètement, la formation d'acide acétique qui repart lorsque la concentration en acide formique a suffisamment baissé.

La teneur en alcool, généralement un peu plus élevée en présence d'acide formique, est ici aussi la résultante de la diminution de la fermentation glycéropyruvique et de l'utilisation de l'éthanal.

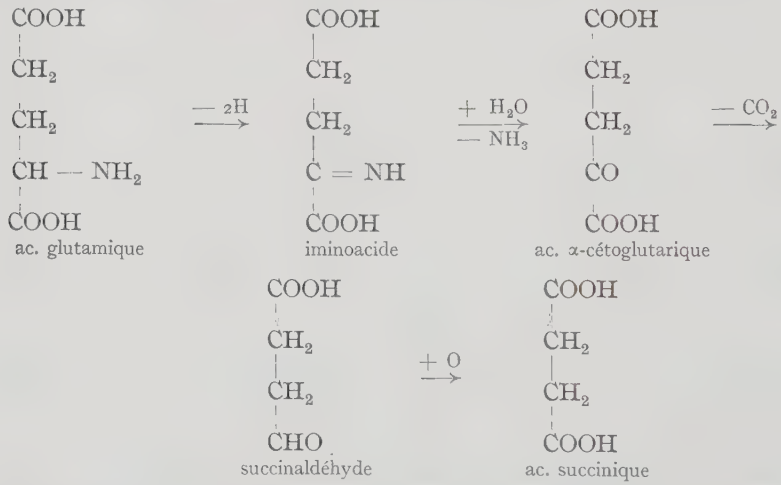
Donc dans les deux cas, l'éthanal formé par la fermentation s'accumule au début par suite de l'inhibition plus ou moins complète de la réaction de formation de l'acide acétique, qui précisément est maximum dans les premiers temps de la fermentation. Cet éthanal est utilisé par deux mécanismes : la fermentation normale, le taux de fermentation glycéropyruvique est ainsi diminué ; et la condensation avec l'acide volatil introduit, qui aboutit finalement à la formation d'acétoïne, puis de 2,3-butanediol par réduction.

Chapitre VI

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

Pasteur a montré le premier la présence d'acide succinique parmi les produits de la dégradation du sucre. Schutzenberger et Destrem (126), Boussingault (12), Claudon et Morin (19), et d'autres auteurs (55), l'ont également signalé et ont admis, comme Pasteur, que cet acide dérive du sucre. Mais Ehrlich en 1909 (25), ajoutant de l'acide glutamique à la levure en fermentation, montra que cet acide aminé est transformé en grande partie en acide succinique ; cet auteur en a déduit que tout l'acide succinique de la fermentation provient de l'acide glutamique de la levure par le mécanisme suivant :

L'aminoacide est d'abord transformé en iminoacide ; celui-ci subit une désamination par hydratation en donnant naissance à l'acide α cétonique correspondant, qui est ici l'acide α cétoglutarique. Ce dernier est décarboxylé en succinaldéhyde qui conduit à l'acide succinique :



Cette théorie a été largement adoptée et est restée classique pour de nombreux auteurs (41). Récemment L. Federico (27) a repris cette hypothèse ; pour cet auteur la formation d'acide succinique est en rapport avec le métabolisme des aminoacides et ne provient pas du sucre ; elle peut se faire même par transamination à partir du glycocolle, par exemple. De petites quantités pourraient également provenir des acides malique et tartrique qui existent dans beaucoup de milieux naturels.

Cependant les expériences de E. Peynaud à la suite de l'hypothèse de L. Genevois, ainsi que les expériences que nous avons faites et qui sont exposées dans le chapitre des fermentations déviées, ont démontré avec quelque certitude que de l'acide succinique se forme à partir de l'éthanal ou de l'acide pyruvique, donc dérive de la molécule de sucre. Kleinzeller en 1951 (57) est arrivé à la même conclusion. Un autre argument important en faveur de cette hypothèse réside dans le fait que la production d'acide succinique dépasse souvent le poids des levures formées ; on ne peut donc dans ce cas invoquer l'acide glutamique des levures comme seule source d'acide succinique, et il faut envisager la production d'acide succinique à partir du sucre.

Mais le mécanisme exact de cette formation n'est pas élucidé. En aérobiose, la condensation oxydative de l'acétate en succinate :

$$2CH_3\,COOH \xrightarrow{O} COOH\,CH_2\,CH_2\,COOH + H_2O$$

a été postulée par Thunberg (136). Les travaux de Sonderhoff (146), avec de la levure appauvrie placée dans une solution acide acétique-acétate et fortement aérée, ont montré qu'il se forme dans ces conditions de l'acide succinique ou de l'acide citrique, alors que l'acide acétique disparaît. Cette réaction avait été également adoptée par Bernhauer (10) dans le cas des moisissures et des bactéries. Mais dans ces conditions d'aérobiose, les mécanismes mis en jeu sont ceux de la respiration et sont bien différents de ceux de la fermentation. Cependant on a supposé que l'acide succinique pouvait se former également en anaérobiose par une condensation analogue, l'éthanal jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène. Mais si une addition d'acide acétique à la fermentation ne semble pas produire une augmentation importante du taux d'acide succinique, cela ne suffit pas à écarter cette hypothèse.

Nous avons conduit plusieurs essais dans le but de voir quelle est la part de la formation d'acide succinique provenant de l'acide glutamique dans la fermentation du moût de raisin.

Première expérience. — Nous avons tout d'abord suivi la formation de l'acide succinique en fonction du sucre fermenté par un *Sacch. ellipsoïdeus*, dans deux milieux différents : moût de raisin à 196 g de sucre par litre et milieu synthétique complet, de composition assez voisine des milieux décrits page 53 et ayant 210 g de saccharose par litre. L'expérience comportait deux flacons de chaque milieu, l'un servait de témoin et l'autre recevait avant le départ de la fermentation une addition de 2 g par litre d'acide glutamique.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 10.

La teneur en acide succinique augmente régulièrement avec la quantité de sucre fermenté, d'une manière presque proportionnelle. Cependant,

la formation est un peu plus forte pour les tout premiers grammes fermentés. Les courbes n'épousent pas les variations des teneurs en éthanal ou en acide acétique et ne représentent pas l'allure de la fermentation glycéropyruvique. Elles n'ont aucun rapport avec la multiplication des levures.

La présence de 2 g supplémentaires d'acide glutamique augmente la formation de l'acide succinique, tout au long de la courbe. Finalement l'augmentation est de 43 p. 100 pour le moût de raisin, de 30 p. 100 pour le milieu synthétique. Or ce moût contenait 123 mg par litre d'azote ammoniacal, alors que le milieu synthétique en contenait 425 ; il est vrai-

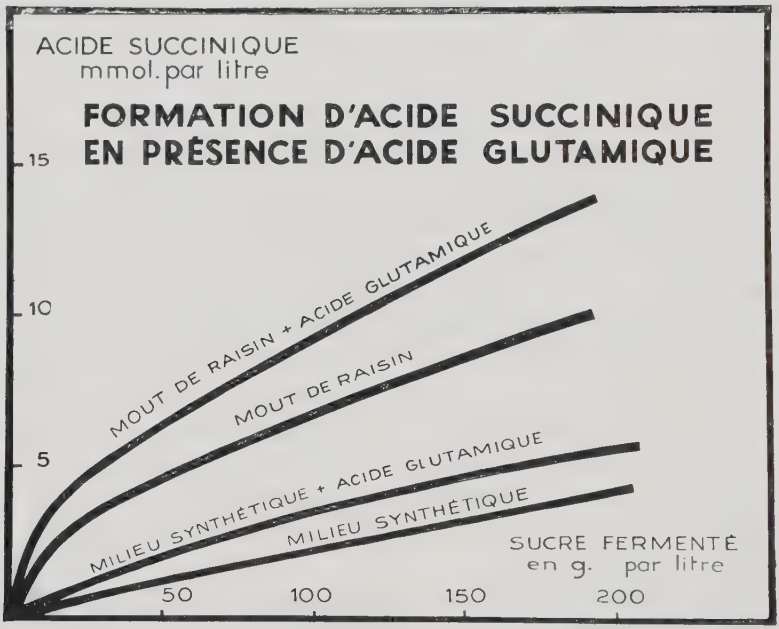


Fig. 10

semblable que les deux faits sont liés, la levure utilisant d'autant plus d'acide glutamique qu'elle a moins d'azote ammoniacal à sa disposition.

Ces faits sont donc conformes à la théorie d'Ehrlich, mais l'existence d'acide succinique en forte proportion après fermentation dans le milieu synthétique témoin pourtant absolument dépourvu d'acide glutamique, appuie notre précédente affirmation d'une autre origine de ce composé, beaucoup plus importante : le sucre.

Deuxième expérience. — Dans le but de préciser les intermédiaires possibles entre l'éthanal ou l'acide pyruvique et l'acide succinique, l'expérience suivante a été effectuée. Nous avons fait fermenter en anaérobiose par un *Sacch. ellipsoïdeus* un milieu synthétique contenant des cendres de levure comme matières minérales, 150 g par litre de saccharose

et les facteurs de croissance nécessaires aux taux déjà indiqués. Le milieu était ajusté à pH 6. Il était additionné de sulfate d'ammonium comme source d'azote ou d'un acide aminé dont on voulait voir la répercussion sur le taux d'acide succinique, à la dose de 2 g par litre. De même, pour étudier l'influence des divers acides organiques, le même milieu contenant du sulfate d'ammonium était additionné d'un acide organique à la dose de 5 g par litre. (A ce sujet, nous avons observé que la présence des acides α cétoglutarique, pyruvique et surtout oxalacétique retardait légèrement le départ de la fermentation.)

Après fermentation complète, nous avons dosé l'acide succinique et le sucre restant. Les mêmes dosages ont été effectués après la fermentation d'un moût de raisin à 210 g de sucre par litre et d'un muté désulfité à

TABLEAU XXVII

Formation d'acide succinique à partir d'acide glutamique et de différents acides aminés

	Acide succinique mmol	Différence
Milieu synthétique + 2 g sulfate NH_4	4,6	
— + 13,6 mmol acide glutamique	10,7	+ 6,1
— + 2 g sulfate NH_4 + 13,6 mmol acide glutamique	4,1	— 0,5
— + 13,7 mmol glutamine	7,1	+ 2,5
— + 13,3 mmol asparagine	5,2	+ 0,6
— + 15,0 mmol acide aspartique	4,7	+ 0,1
— + 22,5 mmol alanine	4,7	+ 0,1
— + 19,0 mmol sérine	4,5	— 0,1
Moût 210 g de sucre	5,2	
— + 13,6 mmol acide glutamique	8,7	+ 3,5
Moût 250 g de sucre	4,3	
— + 13,6 mmol acide glutamique	5,1	+ 0,8

250 g, additionnés ou non de 2 g par litre d'acide glutamique, c'est-à-dire reproduisant les conditions de la première expérience.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux XXVII et XXVIII.

Nous constatons que l'addition d'acide glutamique et à un degré moindre celle de glutamine, augmentent la production d'acide succinique. Il est donc certain qu'il y a intervention du mécanisme d'EHRLICH à partir de l'acide glutamique de la levure et aussi à partir de l'acide glutamique du milieu. Dans ce dernier cas, notre expérience montre que l'utilisation de l'acide glutamique dépend de la teneur du milieu de fermentation en azote ammoniacal, ce qui d'ailleurs avait été déjà constaté par L. GENEVOIS (35). Ainsi dans le milieu minéral, 45 p. 100 de l'acide glutamique ont donné de l'acide succinique lorsque le milieu ne contenait pas d'azote

ammoniacal ; l'augmentation a été à peu près nulle en présence de 425 mg par litre d'azote sous forme ammoniacale.

Les moûts de raisin contiennent naturellement de l'acide glutamique. Les seuls chiffres que nous possédions sur ce sujet sont ceux de CASTOR (17) qui indique comme teneurs extrêmes suivant la variété du raisin, 0,26 à 1,06 g par litre ; cette dernière valeur paraît d'ailleurs très élevée. Si l'on considère l'augmentation produite par 2 g par litre d'acide glutamique, dans le cas où elle est la plus forte : 3,5 mmol d'acide succinique supplémentaires pour 13,6 mmol d'acide glutamique ajoutées, donc une utilisation de 26 p. 100, on calcule que l'acide succinique formé à partir d'acide glutamique dans la fermentation d'un moût de raisin peut être de 0,4 à 1,8 mmol par litre.

TABLEAU XXVIII

Formation d'acide succinique à partir de différents acides organiques

	Acide succinique mmol	Différence
Milieu synthétique sans acide organique	4,6	
— + 37,5 mmol acide l-malique	4,4	— 0,2
— + 37,5 mmol acide dl-malique	4,6	
— + 33,3 mmol acide tartrique	3,2	— 1,4
— + 26,0 mmol acide citrique	3,6	— 1,0
— + 26,0 mmol acide isocitrique	4,8	+ 0,2
— + 34,2 mmol acide α-cétoglutarique	20,0	+ 15,4
— + 38,7 mmol acide aconitique	3,7	— 0,9
— + 43,0 mmol acide fumarique	6,5	+ 1,9
— + 37,9 mmol acide oxalacétique	7,5	+ 2,9
— + 56,8 mmol acide pyruvique	4,8	+ 0,2
— + 65,7 mmol acide glycolique	3,6	— 1,0
— + 55,4 mmol acide lactique	3,9	— 0,7
— + 48,0 mmol acide malonique	4,4	— 0,2
— + 41,6 mmol acide tartronique	3,2	— 1,4
— + 33,8 mmol acide citramalique	3,9	— 0,7

Une autre observation laisse supposer également que le taux d'acide succinique provenant de la réaction d'EHRLICH est faible : lorsqu'on ajoute de l'azote ammoniacal à un moût, le taux d'acide succinique formé n'est pas modifié.

Cette formation, aussi faible soit-elle, donne lieu à une certaine erreur dans les bilans où le chiffre d'acide succinique intervient avec le coefficient 5. Mais cette erreur peut être chiffrée au maximum à $1,8 \times 5 = 9$, c'est-à-dire environ 10 p. 100 des valeurs de Σ habituellement rencontrées. C'est l'ordre de grandeur de la marge d'erreur.

Ce calcul montre encore que la majeure partie de l'acide succinique vient du sucre fermenté, la production d'acide succinique dépassant toujours ce chiffre.

L'expérience précédente qui met en jeu un grand nombre d'acides or-

ganiques, montre que trois d'entre eux sont susceptibles de fournir un supplément d'acide succinique au cours de la fermentation ; ce sont les acides α cétoglutarique, fumarique et oxalacétique. Les acides malique et tartrique, contrairement à certains résultats (27), n'ont pas donné naissance à de l'acide succinique.

L'acide α cétoglutarique COOH — CH_2 — CH_2 — CO — COOH est celui qui donne la plus forte augmentation : 45 p. 100 de la quantité ajoutée sont transformés en acide succinique. Cet acide se transforme en acide succinique par simple décarboxylation oxydative et on admet précisément qu'il est un intermédiaire dans le passage de l'acide glutamique à l'acide succinique par le mécanisme d'Ehrlich. Il est donc logique que son addition augmente le taux d'acide succinique, sans que ce fait du reste impose son intervention dans la formation d'acide succinique par fermentation du sucre. Remarquons que le pourcentage de transformation est ici le même que dans le cas d'une addition d'acide glutamique dans un milieu sans azote ammoniacal.

Les additions d'acide fumarique et d'acide oxalacétique augmentent également le taux d'acide succinique. Nous avons vu dans un chapitre précédent que l'addition d'éthanal ou d'acide pyruvique augmentait aussi la teneur en acide succinique, mais l'effet de l'acide oxalacétique est nettement plus important. Cette observation constituerait un argument en faveur de l'opinion des auteurs, tels A. Kleinzeller (57) qui pensent que l'acide succinique dérive de l'acide pyruvique par carboxylation en acide oxalacétique, puis réduction ; la carboxylation du pyruvate serait une réaction limitante.

La réaction : CH_3CO COOH + CO_2 → COOH CH_2 CO COOH est connue sous le nom de réaction de Wood et Werkman. Ces auteurs, opérant sur des préparations brutes de *M. lysodeikticus* (61) et de foie de pigeon (139) avec du gaz carbonique marqué ($^{13}CO_2$), ont retrouvé le carbone lourd dans le groupement β carboxyle de l'oxalacétate. Kalnitsky et Werkman (52) ont trouvé que des extraits d'*E. coli* incubés avec du gaz carbonique et du pyruvate formaient de l'oxalacétate ou un composé très voisin. Néanmoins, des essais avec des extraits purifiés d'autres microorganismes (112) ou de foie de pigeon (140) capables de décarboxyler l'oxalacétate, ont été négatifs et la réversibilité de la réaction de décarboxylation de l'oxalacétate n'est pas directement prouvée.

Il n'est donc pas certain qu'une telle réaction de carboxylation soit possible chez la levure. D'autre part, si le rattachement de la formation de l'acide succinique aux réactions du cycle de Krebs, dans la fermentation anaérobie du sucre, est une hypothèse séduisante, il n'est nullement démontré qu'elle soit valable, même dans le cas où l'on envisage l'oxydation respiratoire des glucides (62) ; à plus forte raison dans des conditions d'anaérobiose.

Troisième expérience. — Afin de déterminer si l'acide acétique intervient dans la formation de l'acide succinique, nous avons fait fermenter, en anaérobiose par un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, un milieu synthétique de composition habituelle, ajusté à pH 3,5 et 172 grammes de saccharose par litre, en présence de 40 milligrammes par litre d'acétate de sodium marqué d'un carbone radioactif sur le groupement méthyle, $^{14}CH_3$ COO Na. Cette quantité correspondait à une activité β de 420 000 coups par minute, mesurée au compteur de Geiger.

A la fin de la fermentation nous avons isolé d'une part l'acide acétique sous forme d'acétate de potassium et d'autre part l'acide succinique. Nous avons étudié ces deux corps au compteur de Geiger et constaté que tous les deux sont actifs ; les chiffres obtenus sont : acétate de potassium : 138 500 coups/minute, acide succinique : 107 150 coups minute.

L'acide succinique contient du carbone radioactif provenant de l'acétate, en quantité assez importante puisqu'on y retrouve le quart de l'activité initiale de l'acétate ; donc l'acide acétique ajouté intervient dans la formation de l'acide succinique. Ce résultat apporte un argument de poids à l'hypothèse de L. Genevois (32) qui explique la formation normale de l'acide succinique au cours de la fermentation anaérobie du sucre par déshydrogénation et condensation de deux molécules d'acide acétique venant de la réaction de Cannizzaro en présence d'une molécule d'éthanal qui sert d'accepteur d'hydrogène :

$$2CH_3COOH + CH_3CHO \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH + CH_3CH_2OH$$

Il est possible que cette condensation passe par l'intermédiaire du radical cétène $CH^2 — CO$ suivant l'hypothèse de Martius. On pourrait alors écrire par analogie avec ce qui a été admis en aérobiose par certains auteurs :

$$2CH_3COOH \rightarrow 2CH_2 — CO + 2H_2O$$

$$2CH_2 — CO + CH_3CHO \rightarrow COCHCHCO + CH_3CH_2OH$$

$$COCHCHCO + 2H_2O \rightarrow COOHCH_2CH_2COOH$$

Somme :

$$2\,CH_3\,COOH + CH_3\,CHO \rightarrow COOH\,CH_2\,CH_2\,COOH + CH_3\,CH_2OH.$$

La réaction globale est la même et le coefficient de l'acide succinique dans l'équation des produits secondaires reste 5, chiffre qui cadre bien au point de vue quantitatif avec les résultats expérimentaux.

CONCLUSIONS

Nous avons montré dans ce chapitre, d'une manière certaine, que la plus grande partie de l'acide succinique d'une fermentation anaérobie dérive du sucre par l'intermédiaire de l'acide pyruvique et de l'éthanal. La formation à partir de l'acide glutamique selon le schéma d'EHRLICH n'est pas exclue, mais elle demeure toujours très faible.

A la suite de nos expériences, le mécanisme de la formation à partir du sucre est moins obscur. La carboxylation du pyruvate en oxalacétate et le passage de l'acide succinique suivant les étapes malique et fumarique du cycle de KREBS, indiqués par certains auteurs, ne constituent pour le moment qu'une hypothèse non démontrée. Par contre, nous avons pu montrer, grâce à l'emploi d'acétate radioactif, que l'acide acétique intervient dans la formation de l'acide succinique, confirmant ainsi l'hypothèse d'une condensation dismutation qui met en œuvre 5 molécules d'éthanal pour une d'acide succinique.

CHAPITRE VII

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE ET DU 2.3-BUTANEDIOL

La formation d'un glycol au cours de la fermentation alcoolique est connue depuis les travaux de HENNINGER (1882-1888), déjà cités dans l'Introduction. L'acétoïne fut signalée dans les vins dès 1907, mais NEUBERG et ses collaborateurs furent les premiers à démontrer, en 1923, le rôle de l'éthanal dans sa formation. Ils observèrent (87) que si l'on ajoute de la benzaldéhyde à une fermentation, on obtient de l'acétylphénylcarbinol :

$$CH_3\,CHO + C_6H_5\,CHO \rightarrow CH_3 — CO — CHOH — C_6H_5.$$

De même si l'on ajoute de l'éthanal, il se forme de l'acétoïne :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3 — CHOH — CO — CH_3.$$

L'acide pyruvique est décarboxylé avant la réaction de formation de l'acétoïne. L'acétoïne se forme donc par condensation d'une molécule d'éthanal produit intermédiairement avec une molécule d'éthanal ajouté sous l'action d'un enzyme que NEUBERG nomma la « carboligase » (90). Le même mécanisme explique la formation d'une autre acyloïne (ou cétone alcool-α), quand on ajoute à la fermentation l'aldéhyde correspondante. Le 2,3-butanediol est formé par réduction de l'acétoïne. NEUBERG pensait d'ailleurs qu'il n'apparaît pas normalement d'acétoïne au cours de la fermentation du sucre.

KLUYVER et ses collaborateurs (58) ont donné des résultats qualitatifs obtenus en utilisant la réaction de LEMOIGNE. Ils ont expliqué l'absence d'acétoïne dans une fermentation normale par la disparition rapide de l'éthanal par réduction ; ils ont montré que l'addition d'un accepteur d'hydrogène modifie la formation de ces produits. Ces auteurs pensaient qu'il se forme uniquement du butanediol en anaérobiose et uniquement de l'acétoïne en aérobiose.

Deux problèmes sont donc posés par la présence d'acétoïne et de 2,3-butanediol dans les milieux de fermentation : celui de l'existence d'un enzyme spécifique, la « carboligase », telle que la concevait NEUBERG, pour expliquer le mécanisme de formation de l'acétoïne par la levure, et celui de la coexistence dans les milieux fermentés du carbinol et du glycol, avec possibilité d'un équilibre d'oxydoréduction entre les deux corps. Il sera discuté dans ce chapitre de ces deux problèmes.

I. — MÉCANISME DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE

A partir de 1930, DIRSCHERL et son école (22) ont essayé de démontrer dans une série de travaux que la carboligase n'existe pas et que la formation de l'acétoïne est due à la condensation non enzymatique d'une molécule d'éthanal ajoutée ou présente dans le milieu avec une molécule d'éthanal « naissant », provenant de l'acide pyruvique. En effet, la levure ne forme pas d'acétoïne à partir d'éthanal seul, sans acide pyruvique. D'après cet auteur la condensation acyloïnique s'effectue par voie purement chimique et la présence d'aldéhyde active ou « naissante » est nécessaire. C'est également l'opinion de LANGENBECK (69).

Cette hypothèse a été renforcée par le fait que toutes les tentatives pour démontrer avec certitude l'existence d'une carboligase distincte de la carboxylase et pour l'isoler, ont échoué. Cependant certains auteurs, STEPANOV et KUSIN (133), HOFMANN (45) et TOMIYASU (137) par exemple, restaient convaincus de l'existence d'un tel enzyme.

Les études isotopiques de GROSS et WERKMAN (40) avec de l'éthanal deux fois marqué ($^{13}CH_3$ ^{13}CHO) ajouté à une fermentation, ont montré que l'acétoïne formée par la levure à partir de cet éthanal et d'acide pyruvique non marqué était étiquetée sur ses quatre carbones. Cette observation semblerait indiquer la formation d'un intermédiaire symétrique. On a montré par l'étude de certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (144) *Aerobacter aerogenes* (50) *Bacillus subtilis* (77) par exemple, que la synthèse acétoïnique chez ces organismes passe par le terme acide α acétolactique. Dans le cas de la levure, l'étude de l'oxydation par l'acide periodique de l'acétoïne marquée obtenue montre que l'extrémité carbinol de la molécule a une activité beaucoup plus grande que l'extrémité carbonyle (51). L'auteur en conclut que pour la levure, il n'y a pas passage par l'acide α acétolactique comme intermédiaire ; en effet si cet acide était mis en jeu, ce serait l'acide acétique formé par l'oxydation periodique de l'extrémité carbonyle de l'acétoïne qui contiendrait la plus grande part d'isotope.

D'autres arguments infirment la formation intermédiaire d'acide α acétolactique. OCHOA (93) cite en plus de l'observation précédente les raisons suivantes : 1° le système demande les ions Mg^{++} ou Mn^{++} et la diphosphothiamine ; ce dernier point ne s'explique pas si l'on admet la condensation en acide α acétolactique suivie d'une décarboxylation :

$$CH_3\,CO\,COOH + CH_3CHO \rightarrow \begin{array}{l} OH \\ | \\ CH_3{-}C{-}COOH \\ | \\ CO \\ | \\ CH_3 \end{array} \rightarrow CH_3\,CHOH\,COCH_3 + CO_2$$

2° Neuberg avait trouvé que l'acyloïne formée par la levure à partir d'acide pyruvique et de benzaldéhyde est l'acétylphénylcarbinol. Berg et Westerfeld (11) ont obtenu l'acétoïne ou acétylméthylcarbinol par réaction de l'acide pyruvique avec la propionaldéhyde ; s'il y avait eu formation intermédiaire d'acide α propionyllactique dans ce dernier exemple, sa décarboxylation aurait donné le propionylméthylcarbinol et dans l'expérience de Neuberg, il se serait formé le benzoylméthylcarbinol. 3° Il a été montré que des extraits d'*E. coli*, qui ne forment l'acétoïne qu'à partir de pyruvate + éthanal ne contiennent pas la carboxylase α acétolactique.

Il faut donc admettre que le système enzymatique de la levure est différent de celui des bactéries précédemment citées. Puisque la levure ne forme pas d'acétoïne à partir d'éthanal seul, il apparaît que l'éthanal ajouté ne se condense pas avec de l'éthanal libre formé par décarboxylation de l'acide pyruvique. Ochoa pense que cette condensation se fait entre un complexe éthanal-enzyme, dérivant du pyruvate, et l'éthanal ajouté. Il admet les réactions suivantes :

a) Acide pyruvique + enzyme → éthanal-enzyme + CO_2

b) Ethanal-enzyme + ac. pyruvique → ac. α acétolactique + enzyme

↓

acétoïne + CO_2

c) Ethanal-enzyme + éthanal → acétoïne + enzyme

d) Ethanal-enzyme → éthanal + enzyme.

La somme des réactions *a* et *b* représente la synthèse acétoïnique chez les bactéries ; la somme des réactions *a* et *c* représente la réaction chez la levure.

L'éthanal qui se condense avec le complexe éthanal-enzyme dans la formation d'acétoïne au cours de la fermentation normale, provient de l'action de la carboxylase représentée par la somme des réactions *a* et *d*.

Silverman et Werkman (129) étudiant *A. aerogenes* ont montré également que l'éthanal n'était pas impliqué tel quel dans la synthèse acétoïnique. Happold et Spencer (42) ont obtenu le même résultat et ont constaté qu'une addition d'acétate augmente la production d'acétoïne ; ils en concluent que l'acétate ou un corps voisin peut être le composé intermédiaire à deux carbones impliqué, ce qui n'est plus en accord avec les processus réactionnels d'Ochoa.

Ils envisagent donc dans le cas de la levure, où il n'y a pas passage par l'acide α acétolactique, une condensation qui pourrait former du diacétyle, intermédiaire symétrique que paraissent signaler les études isotopiques :

$$CH_3COOH + HOC{-}CH_3 \xrightarrow{-H_2O} CH_3CO\,CO\,CH_3 \xrightarrow{+2H} CH_3CHOH\,CO\,CH_3.$$

Les résultats de nos expériences, décrites en détail dans le chapitre des fermentations déviées, montrent aussi qu'une addition d'acide acé-

tique augmente le taux des corps acétoïniques : acétoïne et son produit de réduction le 2,3-butanediol. Mais une addition d'acide pyruvique ou surtout d'éthanal l'augmente bien davantage. C'est ce qu'Happold et Spencer ont également remarqué pour les tissus de mammifère. On peut donc penser que l'acétate ou un dérivé acétyle est la forme « active » des chercheurs antérieurs, qui se condense avec l'éthanal.

Cette conception se rapproche de l'hypothèse de Martius (73) qui affirme que la première phase de la dégradation de l'acide pyruvique en présence de carboxylase est une déshydrogénation précédant la décarboxylation. Le radical $CH_2 - CO$ obtenu se condense avec l'éthanal pour former du diacétyle qui peut servir d'accepteur d'hydrogène et être réduit en acétoïne ; il y a donc passage dans les fermentations par les étapes diacétyle-acétoïne-2,3 butanediol. Suomalainen et Jännes (135) pensent avoir établi qu'une déshydrogénation de l'acide pyruvique précède la formation de l'acétoïne par la levure et qu'un passage par le terme diacétyle est probable ; ils estiment avoir démontré la formation de ce composé dans des fermentations anaérobies de l'acide pyruvique.

D'autre part, Akabori et Shimazu (1) ont établi que le diacétyle réagit avec l'éthanal en présence de levure, de muscle ou de foie de lapin en donnant de l'acétoïne et de l'acide acétique :

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH$$

cette réaction étant favorisée par une addition de thiamine.

Ils supposent l'existence dans les liquides biologiques du système d'oxydoréduction diacétyle-acétoïne et pensent que la nécessité de la cocarboxylase pour la réaction précédente peut être expliquée en écrivant la dismutation du diacétyle de la façon suivante :

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O \rightarrow CH_3\,COOH + CH_3CHO$$
$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH$$

Les auteurs pensent que la première de ces réactions est une réaction analogue à la décarboxylation de l'acide pyruvique et doit nécessiter la cocarboxylase.

Green et collaborateurs (39) ont isolé une diacétylmutase très spécifique du diacétyle, demandant la diphosphothiamine et qui catalyse la réaction :

$$2CH_3\,CO\,CO\,CH_3 \rightarrow 2CH_3COOH + CH_3\,CHOH\,CO\,CH_3$$

qui est la somme des deux réactions précédentes.

Considérant ces travaux et nos propres résultats, nous pensons que l'acide pyruvique peut subir une décarboxylation oxydative couplée avec

une réduction, peut-être une dismutation de l'éthanal, produit par la décarboxylation, en acide acétique et alcool éthylique :

$$2CH_3\,CO\,COOH \rightarrow 2CH_3\,CHO + 2CO_2$$

$$2CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CH_2\,OH + CH_3\,COOH$$

L'acide acétique formé (ou un composé acétyle voisin) se condenserait avec l'éthanal produit au cours de la fermentation ou ajouté, en donnant de l'acétoïne avec passage possible par l'intermédiaire du diacétyle ; on pourrait l'écrire :

$$CH_3\,CHO + CH_3\,COOH \rightarrow CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O \qquad (1)$$

réaction dépendant de la carboxylase. Un autre fait à l'appui de cette hypothèse est la nécessité de la présence de thiamine que nous avons démontrée dans le chapitre III.

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3COOH \qquad (2)$$

Ce schéma expliquerait la plus grande importance d'une addition d'éthanal : il agirait à la fois comme donateur d'hydrogène et source du composé actif à 2 carbones. L'acide acétique est régénéré et semble avoir un rôle catalytique.

La réaction globale est bien :

$$2CH_3\,CHO \rightarrow CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3.$$

On comprend que l'on n'ait jamais pu séparer une carboligase distincte de la carboxylase puisque celle-ci est nécessaire à la réaction (1).

Il restait à démontrer effectivement la formation de diacétyle au cours de la fermentation du sucre. Nous avons recherché le diacétyle à l'aide de la réaction d'Hooreman, durant le premier et le deuxième jour de la fermentation d'un moût de raisin par un *Saccharomyces ellipsoïdeus* et nous en avons trouvé des quantités dosables : 0,7 et 0,5 mg par litre. Nous l'avons également dosé dans des vins où il se trouve à des taux généralement inférieurs à 1 mg par litre, mais allant jusqu'à 1,8 mg par litre dans un vin d'Algérie.

II. — ÉQUILIBRE ENTRE L'ACÉTOINE ET LE 2,3-BUTANEDIOL

L'acétoïne se forme toujours au cours des fermentations alcooliques. C'est en effet ce que montrent nos analyses : toutes les levures forment de l'acétoïne et du 2,3-butanediol, ce dernier étant produit par réduction de l'acétoïne. Stahly et Werkman (132) au cours d'une étude de la formation de ces composés par *Aerobacillus polymyxa*, ont suggéré la possibilité pour ces deux corps de former un système réversible d'oxydoréduc-

tion, puisque un bas potentiel rédox favorise l'accumulation du glycol et un potentiel rédox élevé celle du carbinol. Mais ce fait ne constitue pas une preuve de l'existence d'un système réversible et d'ailleurs Brockmann et Werkman (15) ont montré, en ajoutant des donateurs d'hydrogène à des bactéries du genre *Aerobacter* qu'un tel système n'existe probablement pas. Il semble, d'après la discussion qui précède, qu'un système d'oxydoréduction puisse être constitué par le diacétyle et l'acétoïne, ainsi que le pensent Akabori et Shimazu ; la réduction ultérieure du carbinol en glycol est logiquement favorisée par l'existence d'un bas potentiel rédox.

CONCLUSIONS

L'étude du mécanisme de la formation des produits butanedioliques : acétoïne et 2,3-butanediol mériterait d'être davantage approfondie. Mais de telles recherches devraient être conduites avec des enzymes purifiés et demandent l'emploi de techniques telles que l'étiquetage par des isotopes lourds ou radioactifs, qui ne sont pas actuellement à notre portée.

La discussion qui précède constitue d'abord une mise au point de l'état actuel des travaux sur la question qui a été étudiée presque uniquement par des auteurs étrangers. Nous apportons deux faits nouveaux qui nous paraissent essentiels à l'interprétation de ces phénomènes : la formation constante de petites quantités de diacétyle, argument qui autorise à considérer le diacétyle comme corps intermédiaire, et surtout le fait que la carence en thiamine diminue spécifiquement la formation des dérivés butanedioliques.

Chapitre VIII

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre travail nous a conduits à un certain nombre de résultats, que nous allons résumer, concernant les variations des produits secondaires avec les conditions de la fermentation, et les mécanismes de leur formation.

Nous avons dû tout d'abord étudier des méthodes de dosage de tous les corps considérés applicables dans les milieux fermentés. Nous avons ainsi été amenés à proposer pour l'acide succinique, sur le principe des méthodes classiques, un nouveau mode opératoire beaucoup plus simple que ceux mis en œuvre jusqu'à maintenant. Il comprend une seule extraction à l'éther en milieu acide dans un appareil continu, suivie de l'élimination des acides fixes par oxydation permanganique en milieu sulfurique et des acides volatils par distillation à la vapeur ; l'acide succinique est titré par la baryte N/20, de pH 4,18 à 7,5 ; on titre ainsi les 7/10 de l'acide succinique de la prise d'essai.

Nous avons également précisé les conditions d'application aux milieux de fermentation riches en éthanol des méthodes d'Hooreman pour le dosage de l'acétoïne, du diacétyle et du 2,3-butanediol.

Nous avons appliqué l'équation d'équivalence entre les produits secondaires et le glycérol dans un grand nombre de cas et dans des conditions très variables. Nous en avons défini les limites de validité. Cette technique des bilans peut se trouver en défaut, lorsqu'on l'applique à un milieu naturel, dans certaines conditions que nous tenons à rappeler :

— le milieu contient de l'acide glutamique en quantité assez grande et peu d'azote ammoniacal. Il peut se former alors une proportion sensible d'acide succinique à partir de l'acide glutamique ;

— il se forme pendant la fermentation de l'acide acétique par voie oxydative pour des levures à forte intensité respiratoire ;

— il se forme dans certaines fermentations naturelles de l'acide acétique par intervention des bactéries, par exemple les bactéries malolactiques dans le cas des vins ;

— enfin, le milieu fermentescible peut déjà contenir certains produits secondaires, du glycérol, de l'acide acétique dans les raisins attaqués par le *Botrytis cinerea*, de l'acide succinique dans certains jus de fruits.

Pour pouvoir appliquer ces bilans, il faut donc réaliser des fermentations très pures, à l'abri de l'air ou en aérobiose, dans des conditions ne permettant pas les phénomènes oxydatifs.

I. — INFLUENCE DE LA RACE DE LEVURE SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

Nous avons étudié les produits secondaires formés par un certain nombre de levures appartenant au genre *Saccharomyces* et à d'autres genres : *Kloeckera, Saccharomycodes, Hansenula, Torulopsis*, etc.

Nous avons trouvé que pour tous les *Saccharomyces*, les *Saccharomycodes* et certaines *Torulaspora*, se vérifie l'équation des produits secondaires proposée par L. Genevois :

$$5s + 2a + b + 2m + h \ldots \leqslant g$$

même en milieu aéré ; elles ont donc un métabolisme uniquement fermentatif.

Un autre groupe de levures comprenant le type *Torulopsis* et le type *Hansenula* ne vérifient pas ce bilan même si l'aération est très faible ; elles forment de grosses quantités d'acide acétique, dont une part est due à la respiration.

Enfin les levures des genres *Kloeckera* et *Hanseniaspora* vérifient le bilan précédent si l'aération est très faible et non en milieu plus aéré où elles respirent en même temps qu'elles fermentent.

En ne considérant que la fermentation, on constate que les levures se différencient non par le taux de la fermentation glycéropyruvique qui varie assez peu d'une levure à l'autre, mais par l'utilisation qu'elles font de l'éthanal contre-partie du glycérol ; cette utilisation dépend de leur composition enzymatique. Remarquons que cette étude montre l'analogie du métabolisme de levures très différentes au point de vue morphologique.

II. — INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

A. — Aération

L'étude de la formation des produits secondaires par deux *Saccharomyces ellipsoïdeus* dans des conditions d'aération croissante, nous a montré l'importance de ce facteur qui, conditionnant l'intensité de la respiration, détermine l'orientation de l'éthanal.

La formation du glycérol et celle de l'acide succinique augmentent avec l'importance de l'aération, le taux d'acide acétique est au contraire

diminué. On n'observe pas de variation systématiquement opposée de l'acétoïne et du 2,3-butanediol, ce qui est contraire à l'hypothèse de l'existence d'un système réversible d'oxydoréduction entre ces deux corps.

B. — Concentration en ions hydrogène

Nous avons fait varier le pH des milieux d'étude de 2,6 à 8,0 et constaté que le taux de la fermentation glycéropyruvique augmente rapidement avec le pH au-dessus de pH 5 ; il y a en milieu alcalin une formation très élevée de glycérol et d'acide acétique. Le taux d'acide succinique augmente aussi avec le taux de la fermentation glycéropyruvique : il se forme deux fois plus d'acide succinique à pH 8 qu'à 2,6 ; les produits acétoïniques diminuent à pH élevé. La diminution de la concentration en ions hydrogène favorise donc les mécanismes des fermentations secondaires. Mais en anaérobiose, malgré les fortes variations des différents produits, le rapport Σ/g varie seulement entre 0,86 et 1,03 ; le bilan des produits secondaires se vérifie même pour des teneurs très élevées en glycérol et en acide acétique, autrement dit Σ/g reste relativement constant malgré de fortes variations des proportions des produits secondaires.

C. — Température

Nous avons déterminé les produits secondaires dans des milieux fermentant à des températures allant de 15 à 35°C. Le taux de fermentation glycéropyruvique augmente un peu avec la température, mais on n'observe pas de forte variation pour aucun des produits, bien que la température agisse sur les réactions d'utilisation de l'éthanal.

D. — Nature du milieu

Les taux des différents produits secondaires varient beaucoup avec la nature et la composition du milieu de fermentation ; nous avons expérimenté avec des milieux naturels : moûts de raisin, de bière, jus de cerises, pêches, tomates, et oranges, et avec un milieu minéral synthétique. Les milieux ayant été amenés au même pH et à la même teneur en sucre, nous avons observé que le 2,3-butanediol a varié de 1 à 2, l'acétoïne de 1 à 5, l'acide succinique de 1 à 3, l'acide acétique de 1 à 2 ; le glycérol est également très différent d'un milieu à un autre. Le milieu intervient donc par son taux en coenzymes et en facteurs de croissance.

E. — Influence des facteurs de croissance

L'absence d'acide pantothénique, de mésoinositol, de thiamine et de biotine dans le milieu de fermentation se traduit par des modifications

importantes dans le taux des produits secondaires formés. L'absence d'acide pantothénique élève la proportion de fermentation glycéropyruvique et augmente de ce fait les récoltes d'acide acétique et de 2,3-butanediol ; l'accumulation d'acide acétique peut être due également à sa non utilisation dans ce milieu carencé. L'absence de mésoinositol ou de biotine diminue au contraire la formation de glycérol et d'acide succinique, mais n'a pas d'action nette sur les autres produits secondaires.

Enfin la carence en thiamine se traduit par une diminution marquée des corps acétoïniques.

Plusieurs facteurs de croissance agissent donc sur les mécanismes de la formation des produits secondaires. Ce rôle qui n'était pas encore connu s'explique si l'on considère que la plupart de ces facteurs agissent comme coferments des enzymes impliqués dans les processus de la fermentation.

L'influence de la teneur en sucre et l'action de certains activeurs de la fermentation ont encore fait l'objet d'études sur la formation des produits secondaires.

III. — ÉVOLUTION DE L'ÉTHANAL LIBRE AU COURS DE LA FERMENTATION

Nous avons suivi dans différentes conditions l'évolution de la teneur en éthanal libre, toujours présent au cours de la fermentation. Cette teneur est en rapport avec deux facteurs, le taux de la fermentation glycéropyruvique et la vitesse d'utilisation de l'éthanal par les enzymes responsables de la formation des produits secondaires. La teneur en éthanal augmente rapidement au début, au moment où le taux de la fermentation glycéropyruvique est grand pendant la phase d'induction ; puis elle passe par un maximum et décroît ; à ce moment, le taux de la fermentation glycéropyruvique est moins élevé et la vitesse d'utilisation de l'éthanal, qui semble être à peu près constante durant tout le cours de la fermentation l'emporte sur sa formation.

Le maximum est plus élevé en anaérobiose qu'en aérobiose bien que la somme des produits secondaires formés n'y soit pas plus grande ; ceci est dû sans doute au fait que les enzymes d'utilisation de l'éthanal sont plus actifs ou à des taux plus élevés en milieu aéré.

La température paraît n'avoir que peu d'influence sur l'évolution de l'éthanal ; il semble cependant qu'à 35°C, la teneur en éthanal soit plus forte au début de la fermentation, ce qui correspondrait à un taux plus élevé de fermentation glycéropyruvique.

L'addition d'un activeur d'origine fongique, du type signalé par Nielsen (poudre de mycélium séché d'*Aspergillus niger*), supprime la

différence entre fermentations aérobie et anaérobie et modifie la courbe d'évolution de l'éthanal ; celle-ci monte plus brutalement au départ, ce qui correspond à une augmentation du taux de la fermentation glycéropyruvique, mais le maximum atteint est très inférieur à celui des témoins. Cet activeur apporte des diastases qui augmentent la vitesse d'utilisation de l'éthanal, donc diminuent la teneur en éthanal libre et suppléent à la carence en enzyme de la levure lorsqu'elle travaille en anaérobiose. Il modifie également la formation des produits secondaires en favorisant surtout celle de l'acide succinique.

Les différents genres de levures donnent des courbes d'évolution d'éthanal libre différentes ; on constate en gros que les levures qui forment le plus d'acide succinique sont celles qui présentent les teneurs les plus faibles en éthanal libre au cours de la fermentation. Ce fait constitue un argument en faveur de l'hypothèse qui fait dériver l'acide succinique de l'éthanal.

IV. — FERMENTATIONS DÉVIÉES ET PRODUITS SECONDAIRES

L'étude de fermentations déviées par addition d'éthanal ou d'acide pyruvique nous a montré que les produits secondaires : acide acétique, acide succinique, acétoïne, 2,3-butanediol dérivent de l'éthanal ou d'un de ses précurseurs ; il en est de même pour l'acide citrique. Quant à l'acide lactique, il paraît se former par hydrolyse de la phosphoglycéraldéhyde.

D'autre part l'étude de l'évolution de l'éthanal libre et des acides volatils au cours de fermentations déviées par addition d'acide acétique ou d'acide formique et le dosage des produits secondaires en fin de fermentation ont fait apparaître des résultats importants :

— La présence d'acide acétique dans un moût en fermentation ne semble pas provoquer une formation plus grande d'acide succinique ; cependant nous montrerons plus loin que la formation de l'acide succinique fait intervenir l'acide acétique.

— En présence d'un acide volatil, il y a une diminution très nette du taux de la fermentation glycéropyruvique. Ceci s'explique par l'accumulation d'éthanal, dont la teneur maximum est le double ou le triple de celle du témoin ; la fermentation normale est favorisée au détriment de la fermentation glycéropyruvique.

— Malgré la diminution du taux de fermentation glycéropyruvique, les produits acétoïniques, acétoïne et 2,3-butanediol, sont très augmentés surtout en présence d'acide formique.

— La teneur en acide acétique est restée à peu près stationnaire dans les fermentations en présence d'acide acétique. En suivant son

évolution en présence d'acide formique, on constate que sa formation est empêchée tout au début, puis freinée pendant un certain temps ; cette période de freinage semble correspondre à l'accumulation d'éthanal, et on peut penser qu'il y a entre les deux phénomènes, une relation de cause à effet

— L'acide formique ajouté avant fermentation diminue d'une façon très variable suivant la levure ; il ne donne pas de formol et très peu de méthanol. D'autre part, le bilan des produits secondaires montre que Σ est souvent supérieur à g en présence d'acide formique ; on peut donc penser que celui-ci est transformé, dans une proportion très variable avec la levure, en produits secondaires, en particulier en produits acétoïniques qui sont très augmentés.

— La formation d'acide lactique est légèrement plus élevée surtout en présence d'acide acétique.

Le taux d'acide citrique n'est pas augmenté par l'addition d'acide formique.

V. — DISCUSSION SUR LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

Nous avons montré expérimentalement que l'addition d'acide glutamique, d'acide fumarique ou d'acide oxalacétique à une fermentation augmente le taux d'acide succinique. Une petite partie de cet acide, en rapport avec la teneur du milieu en acide glutamique, doit donc se former par le mécanisme d'Ehrlich, mais la plus grande part dérive du sucre ; l'augmentation due à une addition d'acide oxalacétique ou d'acide fumarique semblerait indiquer que ces acides sont des intermédiaires. Mais on ne peut pas affirmer que l'acide succinique se forme à partir de l'acide pyruvique par carboxylation conduisant à l'acide oxalacétique, suivie d'une réduction, car ce mécanisme observé chez les bactéries n'a pas pu être mis en évidence chez la levure. Par contre nous avons constaté que l'acide succinique formé à la fin d'une fermentation en présence d'acétate de sodium marqué $^{14}CH_3$ COO Na est radioactif. Ceci est une confirmation de l'hypothèse qui explique la formation de l'acide succinique par déshydrogénation et condensation de deux molécules d'acide acétique.

VI. — DISCUSSION SUR LA FORMATION D'ACETOINE ET DE 2,3-BUTANEDIOL

En nous appuyant sur les résultats des expériences des fermentations déviées (à savoir l'augmentation de production des corps acétoïniques par addition d'acide acétique, d'éthanal et d'acide pyruvique) et sur le fait que nous avons trouvé un peu de diacétyle au cours de la fermentation,

nous avons discuté le mécanisme possible de formation de l'acétoïne, qui a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Il semble que l'on puisse admettre une condensation éthanal-acétate conduisant au diacétyle, puis une oxydoréduction entre une molécule de diacétyle et une autre molécule d'éthanal :

$$CH_3\,CHO + CH_3\,COOH \rightarrow CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + H_2O$$

$$CH_3\,CO\,CO\,CH_3 + CH_3\,CHO \xrightarrow{H_2O} CH_3\,CO\,CHOH\,CH_3 + CH_3\,COOH.$$

Nous avons mis en évidence le rôle très important de la thiamine, qui paraît conditionner la formation des dérivés acétoïniques. Cette observation montre que le complexe carboxylasique est à la base de la formation de ces corps.

Nous avons enfin brièvement discuté la possibilité d'un équilibre d'oxydoréduction acétoïne-2,3-butanediol.

Nous avons donc vérifié que l'équation des produits secondaires proposée en 1936 par L. Genevois est expérimentalement valable dans la plupart des cas de fermentations pures. Nous avons étudié les facteurs qui agissent sur chacun de ses termes et nous avons abordé les problèmes des réactions intermédiaires mises en jeu pour leur formation. Si quelques mécanismes demeurent encore obscurs, nous pensons cependant avoir rassemblé un certain nombre de faits susceptibles d'éclairer différents aspects de ces problèmes.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Akabori (S.) et Shimazu (Y.). — *Proc. Japan Acad.*, 1952, **28**, 36.
(2) Albahary. — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1912, **5**, 147.
(3) André (P.) et Dupuy (P.). — *Ann. Technologie*, 1952, **2**, 213.
(4) André (P.) et Dupuy (P.). — *Ann. Technologie*, 1953, **2**, 31.
(5) Antoniani (C.). — *VII^e Congrès Intern. Ind. Agric.*, Paris, 1948, t. II, p. 194. *Ann. Chim. Applicata*, 1948, **38**, 39. *Atti. Accademia Georgofili*, 1949.
(6) Antoniani (C.) et Gugnoni (S.). — *Ann. Chim. Applicata*, 1941, **31**, 417.
(7) Antoniani (C.) et Trotta (A.). — *Ann. Acad. Agrar. Torino*, 1946-1947, t. 89. Antoniani (C.). *Ind. agrar. progr. vinic.*, 1947.
(8) Babin (R.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91**, 173.
(9) Bechamp (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1863, **56**, 969, 1086 et 1231.
(10) Bernhauer (K.). — *Ergeb. Enzymforschung*, 1934, **3**, 184.
(11) Berg (R. L.) et Westerfeld (W. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **152**, 113.
(12) Boussingault (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1880, **91**, 373.
(13) Brechot (P.) et Haag (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 1847.
(14) Brockmann (M. C.) et Stier (T. J. B.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 413.
(15) Brockmann (M. C.) et Werkman (C. H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1933, **30**, 1146.
(16) Castelli (T.). — *Ann. Microbiologia*, 1941, **19**, 269. *Ibid.*, 1941, **20**, 8.
(17) Castor (J. G. B.). — *Food Research*, 1953, **18**, 139.
(18) Claborn (H. V.) et Patterson (W. I.). — *Journ. Assoc. Off. Agric. Chemists*, 1938, **31**, 134.
(19) Claudon (E.) et Morin (E. C.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1887, **104**, 1109 et 1187.
(20) Connstein (W.) et Luedeke (K.). — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1919, **52**, 1385.
(21) Cordebard. — *Journ. Pharm. Chim.*, 1939, **30**, 263.
(22) Dirscherl (N.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1930, **188**, 225 ; 1931, **201**, 47 et 78 ; 1933, **219**, 177. Dirscherl (N.) et Scholl.ig. *Zeits. phys. Chem.*, 1938, **252**, 53 et 70. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1938, **71**, 418. Dirscherl (N.) et Nahm. *Zeits. phys. chem.*, 1940, **264**, 41.
(23) Duclaux (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1874, **78**, 1160.
(24) Dumas (J. B.). — *Ann. Chim. Phys.*, 1874, **3**, 57.
(25) Ehrlich (F.). — *Biochem. Z.*, 1909, **18**, 391.
(26) Espil (L.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1937, **4**, 1626.
(27) Federico (L.). — *Annali di Chimica*, 1950, **40**, 644.
(28) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1913, **157**, 1478.
(29) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1914, **158**, 1719.
(30) Fernbach (A.) et Schoen (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 475.
(31) Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 295.
(32) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1949, **66**, 329. *Bioch. Bioph. Acta*, 1950, **4**, 179. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1951, **6**, 18, 43, 88 et 111. *Bull. Ass. Microbiol.* Nancy, 1951, n° 44.
(33) Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1954, **21**, 450.
(34) Genevois (L.). — *Mitt. Versuch. Gärungsgewerbe*, 1949, n° 7-8.
(35) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1952, **69**, 27.
(36) Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 693 ; 1947, **224**, 762 et 1388. Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 126 et 439 ; 1948, **227**, 227 ; 1949, **229**, 479 et 777. Peynaud (E.). *Ind. Agric.Alim.*, 1948, **65**, 99. Genevois (L.), Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.).

Rev. Ferm. Ind. Alim., 1947, **2**, 103. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 369.
(37) GENTILINI (L.). — *Ann. Staz. vitic. enol. Conegliano*, 1940, **10**, 255.
(38) GOBIS (L.). — *Ann. Sperim. agrar.*, 1950, **4**, 569.
(39) GREEN (D. E.), STUMPF (P. K.) et ZARUDNAYA (K.). — *J. Biol.Chem.*, 1947, **167**, 811.
(40) GROSS (N. H.), WOOD (H. G.) et WERKMAN (C. H.). — *J. Bact.*, 1942, **44**, 257. GROSS (N. H.) et WERKMAN (C. H.). — *Arch. Biochem.*, 1947, **15**, 125.
(41) HAEHN (H.). — *Biochemie der Gärungen.* W. de Gruyter, Berlin 1952.
(42) HAPPOLD (F. C.) et SPENCER (C. P.). — *Bioch.* et *Bioph. Acta*, 1952, **8**, 543.
(43) HENNINGER (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1882, **95**, 94.
(44) HENNINGER (A.) et SANSON. — *C. R. Acad. Sci.*, 1888, **106**, 208.
(45) HOFMANN (E.). — *Biochem. Z.*, 1931, **243**, 429.
(46) HOOREMAN (M.). — Contribution à l'étude de la fermentation butanediolique. Thèse Sciences, Paris 1948.
(47) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — *Ann. Technologie*, 1953, **2**, 113.
(48) JAULMES (P.) et ESPEZEL (P.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1935, **28**, 325.
(49) JOSLYN (M. A.) et DUNN (R.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 1137.
(50) JUNI (E.). — *Federation Proc.*, 1950, **9**, 396.
(51) JUNI (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1952, **195**, 727.
(52) KALNITSKY (G.) et WERKMAN (C. H.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **4**, 25.
(53) KAYSER (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, **6**, 569.
(54) KAYSER (E.) et DEMOLON (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1907, **145**, 205 ; 1908, **146**, 783.
(55) KAYSER (E.) et DIENERT (F.). — *Ann. Brass. Dist.*, 1901, **4**, 199.
(56) KIESSLING (W.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1949, **66**, 111.
(57) KLEINZELLER (A.). — *Biochem. Journ.*, 1941, **35**, 495.
(58) KLUYVER (A. J.), DONKER (H. J. L.) et VISSER'T HOOFT (F.). — *Biochem. Z.*, 1925, **161**, 361.
(59) KOSTYTSCHEW (S.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1912, **79**, 130.
(60) KOSTYTSCHEW (S.) et HUBBENNET (E.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1912, **79**, 359. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1912, **45**, 1289.
(61) KRAMPITZ (L. O.), WOOD (H. G.) et WERKMAN (C. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **147**, 243.
(62) KREBS (H. A.). — Le cycle des acides tricarboxyliques. Exposés annuels de Biochimie médicale, X^e série, 1949, p. 31.
(63) KUNZ. — *Zeits. Untersuch. Narhungsmittel.*, 1903, p. 721. HEIDE-SCHWENCK. *Rev. Chim. Anal.*, 1913, **21**, 81.
(64) LABORDE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1899, **129**, 344.
(65) LABORDE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1917, **165**, 793. *Bull. Soc. Chim.*, 1918, **23**, 447.
(66) LAFON (M.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1954, **21**, 166.
(67) LAFON (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 847.
(68) LAFOURCADE (S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux 1954. PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). *X^e Congrès Intern. Ind. Agric. Alim.*, Madrid 1954.
(69) LANGENBECK (W.), WREDE (H.) et SCHLOCKERMANN (W.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1934, **227**, 263.
(70) LEDEDEW (A. V.) et GRIAZNOFF. — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1912, **45**, 3256.
(71) MACAGNO. — *Bull. Soc. Chim.*, 1875, **24**, 288.
(72) MARIGNAN (R.). — Thèse Pharmacie, Montpellier 1944.
(73) MARTIUS (C.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1943, **279**, 96.

(74) Mestrezat. — *C. R. Acad. Sci.*, 1906, **143,** 185.
(75) Meyerhof (O.). — *Biochem. Z.*, 1925, **162,** 44.
(76) Meyerhof (O.), Kiessling (W.) et Schulz (W.). — *Biochem. Z.*, 1937, **292,** 25.
(77) Milhaud (G.), Aubert (J. P.) et Gavard (R.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 2026.
(78) Muller. — *Bull. Soc. Chim.*, 1896, **15,** 1204.
(79) Muller-Thurgau (H.) et Osterwalder (A.). — *Landw. Jahrbuch. der Schweitz*, 1914, **28,** 480. 1915, **29,** 40.
(80) Muttelet. — D'après *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25,** 416.
(81) Neish (A. C.). — *Can. Journ. Research*, 1949, **27,** 6.
(82) Neish (A. C.) et Backwood (A. C.). — *Can. Journ. Technology*, 1951, **29,** 123.
(83) Neubauer (O.) et Fromherz (K.). — *Zeits. phys. Chem.*, 1910, **70,** 326.
(84) Neuberg (C.) et Farber (E.). — *Biochem. Z.*, 1916, **78,** 238.
(85) Neuberg (C.) et Hildesheimer (A.). — *Biochem. Z.*, 1911, **31,** 170. Neuberg (C.) et Karczag (L.). *Ibid.*, 1911, **36,** 60, 68 et 76 ; 1912, **43,** 44 et 491 ; 1912, **47,** 405. Neuberg (C.). *Biochem. Z.*, 1915, **71,** 1.
(86) Neuberg (C.) et Hirsch (J.). — *Biochem. Z.*, 1919, **96,** 175 ; 1919, **98,** 141 ; 1919, **100,** 304. Neuberg (C.), Hirsch (J.) et Reinfurth (E.). *Ibid.*, 1920, **105,** 307. Neuberg (C.) et Reinfurth (E.). *Ibid.*, 1920, **106,** 281. Neuberg (C.) et Ursum (W.). *Ibid.*, 1920, **110,** 193.
(87) Neuberg (C.) et Hirsch (J.). — *Biochem. Z.*, 1921, **115,** 282.
(88) Neuberg (C.) et Kerb (J.). — *Biochem. Z.*, 1914, **58,** 158. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1914, **47,** 2730.
(89) Neuberg (C.) et Reinfurth (E.). — *Biochem. Z.*, 1918, **89,** 365 ; 1918, **92,** 234. *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1919, **52,** 1677.
(90) Neuberg (C.) et Reinfurth (E.). — *Biochem. Z.*, 1923, **143,** 553.
(91) Nielsen (N.) et Hartelius (V.). — *C. R. Labo Carlsberg*, 1937, **22,** 1.
(92) Novelli (G. D.) et Lipmann (F.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **171,** 833.
(93) Ochoa (S.). — *Physiol. Rev.*, 1951, **31,** 56.
(94) Pasteur (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1858, **46,** 179 et 857.
(95) Pasteur (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1859, **48,** 1149.
(96) Pasteur (L.). — *Ann. Chim. Phys.*, 1860, **58,** 323.
(97) Peltier (R.). — *P. V. Soc. Sci. Phys. Bordeaux*, 1913, **4.**
(98) Peynaud (E.). — *Bull. int. Vin*, 1938, **118,** 33.
(99) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **41,** 384.
(100) Peynaud (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1946, **13,** 685. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 1947, **2,** 150.
(101) Peynaud (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux 1946.
(102) Peynaud (E.). — *Ann. Chim. Anal.*, 1946, **28,** 111.
(103) Peynaud (E.). — *Ann. Ferm.*, 1939, **5,** 321.
(104) Peynaud (E.). — *Ind. Agric. Alim.*, 1948, **65,** 99. Genevois (L.), Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224,** 762.
(105) Peynaud (E.). — *Rev. Vitic.*, 1938, **88,** 88.
(106) Peynaud (E.) et Charpentie (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1954, **47,** 85.
(107) Peynaud (E.) et Charpentie (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1950, **43,** 246.
(108) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Ann. Technologie*, 1954, **3,** 265.
(109) Peynaud (E.) et Lafon (M.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18,** 482. *Ann. Falsif. Fraudes*, 1951, **44,** 264 et 399.
(110) Peynaud (E.) et Lafon (M.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1952, **69,** 397.
(111) Peynaud (E.) et Ribereau-Gayon (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224,** 1388.

(112) Plaut (G. W. E.) et Lardy (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, **180,** 13. Korkes (S.), Del Campillo (A.) et Ochoa (S.). *J. Biol. Chem.*, 1950, **187,** 891.
(113) Poux (C.) et Ournac (A.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1949, **66,** 503.
(114) Pozzi-Escot (M.). — *Rev. Chim. Anal.*, 1908, **16,** 439. *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **147,** 600.
(115) Pritzker (J.) et Jungkunz (R.). — *Unters. Lebensm.*, 1930, **60,** 484.
(116) Rankine (B. C.). — *Australian Journ. Applied Sci.*, 1953, **4,** 590.
(117) Rau. — *Rev. Chim. Anal.*, 1892, **2,** 215.
(118) Ribereau-Gayon (J.), Lafourcade (S.) et Lafon (M.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1950, **67,** 477.
(119) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222,** 457.
(120) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73,** 777.
(121) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237,** 670. Peynaud (E.) et Lafon (M.). *X^e Congrès Intern. Ind. Agric. Alim.*, Madrid 1954.
(122) Ribereau-Gayon (J.), Peynaud (E.) et Lafon (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 757.
(123) Ribereau-Gayon (J.) , Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234,** 251.
(124) Rodopoulo (A. K.). — *Mikrobiologija*, 1953, **22,** 530.
(125) Roeser (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1893, **7,** 41.
(126) Schutzenberger (P.) et Destrem (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1879, **88,** 593.
(127) Schweizer. — *Helvetica Chim. Acta*, 1918, **2,** 167.
(128) Sebrell (W. A.) et Harris (R. S.). — *The Vitamins*, Academic Press Inc., New-York 1954.
(129) Silverman (M.) et Werkman (C. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138,** 35.
(130) Slonimski (P. P.). — *II^e Congrès Intern. Biochimie*, 1952, *C. R.*, p. 94. Ephrussi (B.) et Slonimski (P. P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230,** 285. Slonimski (P. P.). *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson éd., Paris 1953.
(131) Slonimski (P. P.) et Hirsch (H. M.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **235,** 741.
(132) Stahly (G. L.) et Werkman (C. H.). — *Biochem. Journ.*, 1942, **36,** 575.
(133) Stepanov (A.) et Kusin (A.). — *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 1930, **63,** 1147.
(134) Straub. Mach et Portele. — D'après *Ann. Brass. Dist.*, 1901, **4,** 199.
(135) Suomalainen (H.) et Jännes (L.). — *Nature*, 1946, **157,** 336.
(136) Thunberg (T.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1920, **40,** 1.
(137) Tomiyasu (Y.). — *Biochem. Z.*, 1936, **289,** 97.
(138) Trillat (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **146,** 645. Trillat (A.) et Sauton (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1908, **146,** 996.
(139) Utter (M. F.) et Wood (H. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164,** 455.
(140) Veiga Salles (J. B.), Harary (I.), Banfi (R. F.) et Ochoa (S.). — *Nature* (Londres), 1950, **165,** 675.
(141) Ventre (J.). — *Rev. Vitic.*, 1934, **80,** 181.
(142) Ventre (J.). — *Ann. Ferm.*, 1937, **3,** 447.
(143) Vergnaud (P.). — *Ind. Agric. et Alim.*, 1949, **66,** 217.
(144) Watt (D.) et Krampitz (L. O.). — *Federation Proc.*, 1947, **6,** 301.
(145) Westerfeld (W. W.). — *Journ. Biol. Chem.*, 1945, **161,** 495.
(146) Wieland (Th.) et Sonderhoff (R.). — *Ann. der Chemie*, 1932, **499,** 213. Sonderhoff (R.) et Deffner. *Ibid.*, 1936, **525,** 132. Sonderhoff (R.) et Thomas (H.). *Ibid.*, 1937, **530,** 195.
(147) Wortmann. — *Landwirts. Jahrb.*, 1894, **23.**

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES

I. — **Étude d'une méthode de dosage de l'acide succinique.** 21
a) Essai de la technique de Marignan. 22
b) Précipitation de l'acide succinique à l'état de succinate de baryum 23
c) Étude d'une titration potentiométrique. 24
d) Mode opératoire de la méthode proposée. 25
e) Recherche de substances donnant de l'acide succinique par oxydation permanganique. Recherche de 1,4 butanediol 26
II. — **Dosage des composés acétoïniques.** 27
III. — **Dosage de l'acide formique et du formol.** 29

CHAPITRE II

ÉTABLISSEMENT DES BILANS DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION AVEC DIVERSES LEVURES

I. — **Etude des Saccharomyces ellipsoïdeus** 33
II. — **Etude des levures appartenant à d'autres genres.** 38
III. — **La classification d'Antoniani.** 41
IV. — **Conclusions.** 42

CHAPITRE III

INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

I. — **Influence de l'aération.** 43
II. — **Influence de la concentration en ions H^+** 46
III. — **Influence de la température.** 49
IV. — **Influence de la nature du milieu.** 50
V. — **Influence des facteurs de croissance.** 53
VI. — **Influence de la teneur en sucre.** 56
VII. — **Action d'un activeur de fermentation d'origine fongique.** 59
VIII. — **Conclusions.** 61

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN ÉTHANAL AU COURS DE LA FERMENTATION

I. — **Influence de la teneur en azote ammoniacal.** 66
II. — **Influence de la concentration en ions H^+.** 67
III. — **Influence de la température** 68
IV. — **Influence de la teneur en sucre.** 69
V. — **Influence d'un enrichissement en thiamine et d'un activeur de fermentation d'origine fongique.** 70
VI. — **Évolution de l'éthanal au cours de la fermentation par trois espèces de levures.** 73
VII. — **Conclusions.** 75

CHAPITRE V

FERMENTATIONS DÉVIÉES ET FORMATION DES PRODUITS SECONDAIRES

I. — **Additions d'éthanal au cours de la fermentation.** 77
a) Bilan de l'éthanal. 78
b) Formation d'acide citrique. 80
c) Formation d'acide lactique. 80
II. — **Additions d'acide pyruvique au cours de la fermentation** 81
Bilan de l'acide pyruvique. 82
III. — **Fermentations en présence d'acides gras volatils.** 83
a) Addition d'acide acétique. 83
b) Évolution de l'éthanal et de l'acide acétique dans des fermentations en présence d'acide acétique. 85
c) Fermentation en présence d'acide formique. 86
d) Discussion. 89

CHAPITRE VI

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE

CHAPITRE VII

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ACÉTOINE ET DU 2, 3-BUTANEDIOL

I. — **Mécanisme de la formation de l'acétoïne.** 101
II. — **Equilibre entre l'acétoïne et le 2,3-butanediol.** 104

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

BIBLIOGRAPHIE

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

PRINCIPES ET TECHNIQUES DE LA CHROMATOGRAPHIE

VU ET APPROUVÉ :

Bordeaux, le 3 novembre 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. BRUS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 5 novembre 1954.

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

E. DELAGE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 10-1-1956.

Dépôt légal : 4e trimestre 1955 *N° d'impression : 814*